

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Mikrobiologie



Bc. Petra Rašmanová

Analýza izolátů streptomycet obsahujících gen pro cyklizující aminolevulinátsyntázu

Analysis of streptomycete isolates carrying a cyclizing aminolevulinate synthase gene

Diplomová práce

Vedoucí práce: Mgr. Kateřina Petříčková, Ph.D.

Praha, 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 4. 6. 2020

Bc. Petra Rašmanová

Poděkování:

Největší díky patří mé školitelce Mgr. Kateřině Petříčkové, Ph.D. za všechnen čas, který mi po celou dobu mého studia věnovala, za trpělivost, se kterou ke mně přistupovala, a za všechny cenné rady, které mi dopomohly přivést práci ke zdárnému závěru.

Rovněž bych chtěla poděkovat Ing. Davidu Kahounovi, Ph.D. za pomoc při měření vzorků, vyhodnocování analýz a za ochotu a vstřícnost ke všem mým dotazům. Poděkování patří také RNDr. Janu Bobkovi, Ph.D. za poskytnutí vhodných podmínek pro mé experimenty v jeho laboratoři.

V neposlední řadě patří mé díky Baruš Jílkové za všeobecnou podporu, mému Radkovi za pomoc s grafickou stránkou a překladem, a nakonec mé mamce za to, že je.

Abstrakt

Bakterie rodu *Streptomyces* jsou známí producenti mnoha biologicky aktivních metabolitů. Jejich sekundární metabolismus je zdrojem mnoha významných skupin aktivních látek, při jejichž výzkumu se poslední dobou uplatňuje celá řada nových metod založených např. na bioinformatické analýze genomových dat, moderních LC-MS technikách a metodách metabolického modelování.

Tato práce vychází z genetického screeningu na přítomnost specifického genu (*als*) pro cyklizující aminolevulinát syntázu, který dle dřívějších studií můžeme považovat za genetickou značku producentů sekundárních metabolitů s tzv. C₅N jednotkou (2-amino-3-hydroxycyklopent-2-enonem). Mezi takové látky se řadí několik skupin metabolitů s variabilní strukturou i biologickou aktivitou, mezi nimi i manumyciny. Jedná se o malé polyketidy se slabou antibiotickou aktivitou zejména proti gram-pozitivním bakteriím. Důležitější jsou však jejich kancerostatické a protizánětlivé účinky. Kmeny *Streptomyces monomycini* BCCO10 1552 a *Streptomyces capoamus* BCCO10 1636 jsou pozitivními izoláty pocházejícími z genetického screeningu zaměřeného na přítomnost genu *als*, které se ve fylogenetickém stromu sestrojeném na základě podobnosti sekvencí genu *als* nacházejí v blízkosti producentů manumycinových látek. Cílem této práce bylo zjistit, zdali tyto nové přírodní izoláty produkují nějaké látky s C₅N jednotkou, a blíže je charakterizovat. V obou případech byly tedy vytvořeny jak kmeny mutantní v *als* genu, tak kmeny exprimující *als* pod kontrolou silného konstitutivního promotoru. Dle předchozích zkušeností víme, že nadprodukce cyklizující aminolevulinát syntázy velmi často zásadně zvyšuje produkci látek s C₅N jednotkou. U kmene BCCO10 1636 jsme takto prokázali produkci látek, které by měly mít přímou souvislost s přítomností genu pro cALAS a které vykazují slabou antibiotickou aktivitu proti referenčnímu kmeni *B. subtilis*. V případě kmene BCCO 1552 nejsou výsledky příliš jednoznačné, navíc analýza později dostupných genomových dat ukázala, že v genomu chybí esenciální gen pro enzym připojující C₅N jednotku ke kostře antibiotik a též další přítomné geny v daném genomovém lokusu příliš nenaznačují, že by zde mohl být přítomen biosyntetický genový shluk kódující produkci nějakého sekundárního metabolitu.

Klíčová slova: streptomycety, sekundární metabolismus, manumyciny, cyklizující 5-aminolevulinát syntáza

Abstract

Streptomyces bacteria are well-known producers of many bioactive metabolites. Its secondary metabolism is a source of many important groups of active compounds that are recently investigated by means of many new methods based on bioinformatic analyses of genome data, modern LC-MS techniques, and metabolic modeling methods.

This thesis originates from the genetic screening for a specific gene (*als*) for cyclizing 5-aminolevulinate synthase. Based on earlier studies, we consider this gene as a genetic tag of the producers of secondary metabolites containing the C₅N unit (2-amino-3-hydroxycyclopent-2-enon). Such metabolites include several groups with variable structures and biological activities, which include manumycins as well. Manumycins are small polyketides with a weak antibiotic activity, especially against gram-positive bacteria. However, its cancerostatic and anti-inflammatory effects are of greater importance. *Streptomyces monomycini* BCCO10 1552 and *Streptomyces capoamus* BCCO10 1636 strains were found positive for the presence of the *als* gene in the targeted genetic screening. By the *als* phylogeny, they cluster near the producers of manumycin compounds. This thesis aimed to determine whether these new natural isolates produce any compounds containing C₅N unit, and to characterize them in more detail. In both cases, *als* gene-deficient mutants and strains expressing *als* under the control of a strong constitutive promoter were created. According to previous experience, we already know that the overproduction of cyclizing aminolevulinate synthase often increases the production of substances with a C₅N unit significantly. In the BCCO10 1636 strain, we have proven the production of substances that seem to be directly linked to the presence of the gene for cALAS and which show weak antibiotic activity against the reference *B. subtilis* strain. In the case of BCCO10 1552 strain, the results are not so clear. Moreover, the analysis of its genomic data, available later, showed that the genome lacks an essential gene for the enzyme attaching the C₅N unit to the antibiotic backbone. Also, the other genes present in a given genomic locus do not suggest that a biosynthetic gene cluster encoding the production of a secondary metabolite may be present.

Key words: streptomycetes, secondary metabolism, manumycins, cyclizing 5-aminolevulinate synthase

Obsah

1	Úvod.....	10
2	Cíle práce a hypotéza	11
2.1	Cíle práce	11
2.2	Hypotéza	11
3	Přehled literatury	12
3.1	Charakteristika bakterií rodu <i>Streptomyces</i>	12
3.1.1	Způsob života	15
3.1.2	Genom bakterií rodu <i>Streptomyces</i>	18
3.3	Sekundární metabolity	18
3.3.1	Manumyciny.....	20
3.3.1.1	Účinky manumycinů	21
3.3.1.2	Biosyntéza manumycinů	22
3.3.1.3	Cyklizující aminolevulinát syntáza	28
3.3.2	Hledání producentů nových bioaktivních látek.....	32
4	Materiál a metody	35
4.1	Materiál.....	35
4.1.1	Bakteriální kmeny	35
4.1.2	Vektory.....	36
4.1.3	Kultivační média	40
4.1.4	Roztoky a pufry	42
4.1.5	Enzymy.....	47
4.1.6	Antibiotika.....	47
4.1.7	DNA oligonukleotidy	48
4.1.8	Velikostní standard.....	49
4.1.9	Komerční kity.....	50

4.2 Metody	51
4.2.1 Metody izolace DNA	51
4.2.2 Metody další práce s DNA	57
4.2.3 Metody transformace buněk plasmidovou DNA	62
4.2.4 Analytické a separační metody	64
5 Vypracování a výsledky	69
5.1 Srovnání aminokyselinových sekvencí homologů genů <i>als</i>	69
5.2 Genetická analýza kmene BCCO10 1636	70
5.3 Disrupce genu <i>als</i> u kmene BCCO10 1636	73
5.4 Příprava nadprodukčního kmene BCCO10 1636	90
5.5 Analýza extraktů sekundárních metabolitů kmene BCCO10 1636	90
5.5.1 Analýza kmene BCCO10 1636 kultivovaného v GYM médiu s glycerolem	91
5.5.2 Analýza kmene BCCO10 1636 kultivovaného v GYM médiu s glukózou ...	96
5.6 Genetická analýza kmene BCCO10 1552	101
5.7 Disrupce genu <i>als</i> u kmene BCCO10 1552	105
5.8 Příprava nadprodukčního kmene BCCO10 1552	118
5.9 Analýza extraktů sekundárních metabolitů kmene BCCO10 1552	118
6 Diskuse.....	128
7 Závěr.....	133
8 Seznam použité literatury.....	134

Seznam zkratek

3,4-AHBA	3-amino-4-hydroxybenzoová kyselina
5-ALA	Kyselina 5-aminolevulová
A ₂₆₀	Absorbance při vlnové délce 260 nm
ALAS	Aminolevulinát syntáza
ALL	Aminolevulinát-CoA ligáza
AMS	Amidsyntáza
BGC	Biosyntetický genový shluk (biosynthetic gene cluster)
Bp	Párů bazí (angl. base pair)
cALAS	Cyklizující aminolevulinát syntáza
CRC	Kolorektální nádorová buněčná linie
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Deoxynukleosid trifosfát
EDTA	Kyselina ethylendiaminotetraoctová
FPP	Farnesylpyrofosfát
GTP	Guanosintrifosfát
IPTG	Izopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid
LC	Kapalinová chromatografie (angl. liquid chromatography)
LR	Levé rameno
MCS	Vícenásobné klonovací místo (angl. multiple cloning site)
MS	Hmotnostní spektrometrie (angl. mass spectrometry)
OD ₆₀₀	Optická denzita při vlnové délce 600 nm
PARP	Poly(ADP-ribóza)polymeráza
PCR	Polymerázová řetězová reakce (angl. polymerase chain reaction)
PEG	Polyethylenglykol
PKS	Polyketid syntáza
PR	Pravé rameno
RE	Restrikční endonukleáza

ROS	Reaktivní kyslíkové radikály
rpm	Počet otáček za minutu (angl. revolutions per minute)
TLC	Chromatografie na tenké vrstvě (angl. thin-layer chromatography)
Tris	Tris(hydroxymetyl)aminomethan
UV	Ultrafialové záření (angl. ultraviolet)
VIS	Viditelné záření (angl. visible)
WT	Divoký typ (angl. wild type)
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid

1 Úvod

Bakteriální metabolismus je napříč všemi druhy bakterií velmi rozmanitý. Vedle primárního metabolismu, který zajišťuje přežití buňky, existuje současně i sekundární metabolismus, který se také občas nazývá specializovaným. Tento název napovídá, že se jedná o metabolismus, jenž zahrnuje takové biosyntetické dráhy, které jsou spuštěny pouze za určitých podmínek, jako je například stres z vyčerpání živin. Tento typ metabolismu není známý jen u bakterií, ale také u hub anebo rostlin. V případě bakterií je obvykle spojen se stacionární fází a případnou sporulací (Běhal 2000). Dochází ke změně způsobu využití energie a změně toku uhlíku od produkce biomasy k produkci malých bioaktivních molekul, které napomáhají přežití buňky, ale nejsou pro její funkci esenciální. Nízkomolekulární biologicky aktivní látky přírodního původu se tradičně využívají v humánní a veterinární medicíně. Řadí se mezi ně molekuly například s protinádorovými, antibiotickými, imunosupresivními anebo cholesterol snižujícími účinky atd. (Ruiz *et al.*, 2010).

Streptomycety jsou jedněmi z významných producentů sekundárních metabolitů s bioaktivními vlastnostmi. Jedná se o vláknité sporulující bakterie žijící převážně v půdě. Téměř dvě třetiny současně známých antibiotik jsou produkovány právě streptomycetami (Khattab *et al.* 2016) a řadí se mezi ně i manumyciny. Působí proti gram-pozitivním bakteriím a plísním, mají kancerostatické, imunosupresivní a protizánětlivé účinky (Hu 2000). Typickou strukturu manumycinů tvoří šestičlenný kruh nazývaný mC_7N jednotka (2-amino-4-hydroxycyklohex-2-enon), k ní připojený variabilní horní řetězec a konzervovaný dolní řetězec, oba vznikající polyketidovou syntézou. Dolní řetězec může zůstat zakončen v podobě karboxylové kyseliny anebo, častěji, je k němu připojena ještě C_5N jednotka (2-amino-3-hydroxycyklopent-2-enon). Prekurzorem této C_5N jednotky je kyselina 5-aminolevulová, která vzniká kondenzací glycinu a sukcinyl-CoA, přičemž dochází i k následné cyklizaci, a to vše díky unikátnímu enzymu cyklizující 5-aminolevulunát syntáza (Zhang *et al.* 2010). Tento unikátní enzym je kódován genem *als*, homologem genu *hemA*, který byl použit jako genetická značka při vyhledávání nových producentů látek obsahujících C_5N jednotku (Petříčková *et al.* 2015). Pro tuto práci byly vybrány dva kmeny pozitivní na přítomnost genu *als*.

2 Cíle práce a hypotéza

2.1 Cíle práce

Provést analýzu vybraných nových potenciálních producentů:

- a. ověřit aktivitu *als* genu a celého souvisejícího biosyntetického genového shluku
- b. pokusit se identifikovat látky, které aktivitou genového shluku vznikají
- c. ověřit jejich biologickou aktivitu

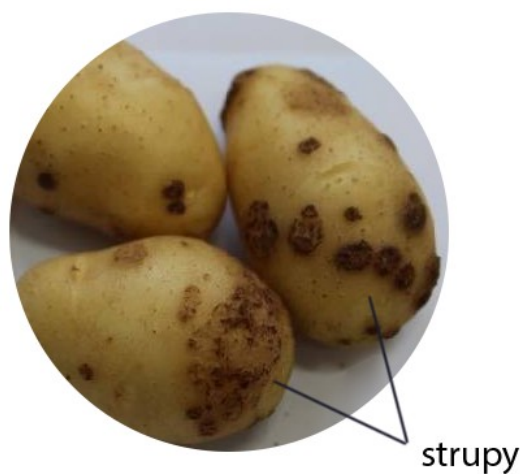
2.2 Hypotéza

Pozitivní izoláty kmenů BCCO10 1552 a BCCO10 1636 na přítomnost genu *als* produkují sekundární metabolity obsahující bioaktivní látky s C₅N jednotkou. U kmene BCCO10 1636 očekáváme produkci manumycinů vzhledem k tomu, že kmen je na základě *als* genu umístěn ve fylogenetickém stromě mezi producenty manumycinů. Kmen BCCO10 1552 je v rámci fylogenetického stromu samostatně umístěný izolát, kromě manumycinů můžeme očekávat produkci i zcela jiných látek s C₅N jednotkou.

3 Přehled literatury

3.1 Charakteristika bakterií rodu *Streptomyces*

Streptomycety jsou vláknité sporulující bakterie patřící do kmene *Actinobacteria*, řádu *Actinomycetales* a čeledi *Streptomycetaceae*, přičemž se jedná o nejpočetnější rod tohoto řádu (Goodfellow 2012). Jsou to gram-pozitivní, obligátně aerobní saprofytické bakterie vyskytující se především v půdě, například jako součást rhizosféry nebo jako endofyty kolonizující vnitřní části rostliny (kořeny, xylém). Streptomycety tvoří až 40 % všech půdních bakterií a hrají velmi důležitou roli při přeměně organického materiálu a mineralizaci (Manteca a Sanchez 2010; Seipke *et al.* 2012). Právě streptomycety jsou díky svým metabolitům původcem typického půdního zemitého zápachu, který je obzvláště patrný při dešti (Boone *et al.* 2010; Vurukonda 2018). Příkladem takového metabolitu je geosmin (Gerber a Lechevalier 1965). Přesto, že streptomycety jsou převážně mezofilní organismy (ideální teplota pro růst se pohybuje od 15 °C do 37 °C, přičemž optimum je 25 °C), můžeme mezi nimi najít termotolerantní i termofilní druhy, které dokážou růst v teplotním rozmezí od 28 °C do 55 °C (Kim *et al.* 1996). *Streptomyces thermofucus* a *Streptomyces thermophilus* dokonce dokáží růst při 65 °C (Waksman *et al.* 1939). Pro takové termofilní druhy je potom ideální prostředí pro růst například kompost, sopečné půdy nebo pouštní stepní půdy (Kim *et al.* 1999; Zenova *et al.* 2009; Kurapova *et al.* 2012). Streptomycety můžeme ale najít i ve sladkých vodách či v mořích, například v mořském sedimentu, jako symbionty mořských řas, hub nebo korálů (Hakvag *et al.* 2008; Zhao *et al.* 2009; Hodges *et al.* 2012; Xu *et al.* 2019). Mimo jiné se streptomycety vyskytují i jako patogeny rostlin – mohou způsobovat nemoci podzemních částí, například kořenů a hlíz. Mezi nejznámější onemocnění rostlin způsobené streptomycetami je tzv. strupovitost brambor a dalších plodin (Obr. 1), nejčastěji na bramborách, za které je odpovědná především bakterie *Streptomyces scabies* (Zhang a Loria 2017; Zhang *et al.* 2018).



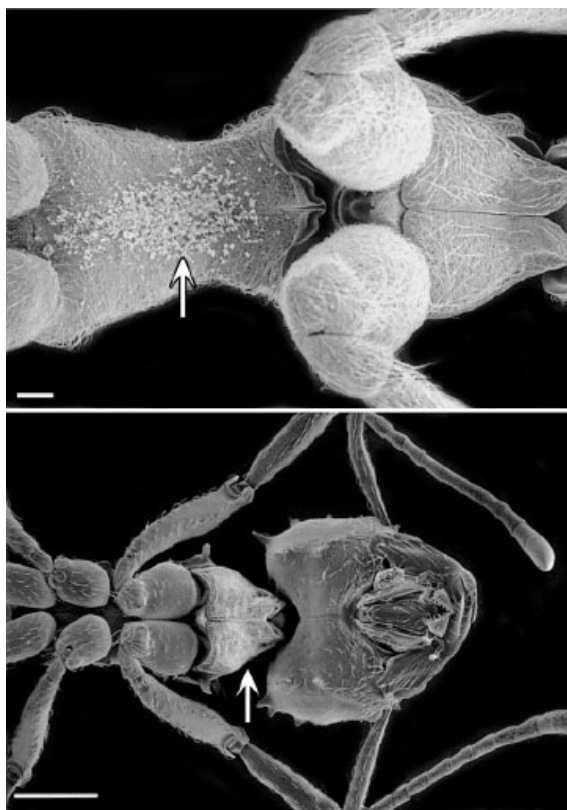
Obr. 1 Strupovitost brambor po infekci *Streptomyces scabies*. Na obrázku můžeme vidět tvorbu strupů na slupce brambor (upraveno podle Lin *et al.* 2018).

Streptomycety se rovněž můžou vyskytovat jako symbionti živočichů (Nechitaylo *et al.* 2014). Nejčastěji se nacházejí v gastrointestinálním traktu býložravého hmyzu (Pinheiro *et al.* 2016). V tab. 1 jsou uvedeny příklady interakcí mezi streptomycetami a bezobratlými.

Živočich	Místo symbiózy	Způsob symbiózy	
Termiti (<i>Isoptera</i>)	trávicí trakt	trávení lignocelulosity pomocí celulolytických enzymů streptomycet	Schäfer <i>et al.</i> 1996
Oblovka žravá (<i>Achatina fulica</i>)	trávicí trakt	trávení lignocelulosity pomocí celulolytických enzymů streptomycet	Pinheiro <i>et al.</i> 2016
Květolib včelí (<i>Philanthus triangulum</i>)	žlázy na tykadlech samic; následné očkování stěn mateřských komůrek	ochrana kokonu před napadením plísněmi produkcí antibiotik	Kaltenpoth <i>et al.</i> 2005

tropičtí mravenci (angl. fungus-growing ants, lat. <i>Attina</i>)	kutikula samic pečujících o tzv. „zahrádky“ k potravě (obr. 2)	produkce antibiotik selektivně inhibující růst parazitické virulentní houby rodu <i>Escovopsis</i> , která napadá mravenčí zahrádky	Currie <i>et al.</i> 1999
--	--	---	---------------------------

Tab. 1 Příklady interakce mezi streptomycetami a bezobratlými.



Obr. 2 Snímky z elektronového skenovacího mikroskopu zobrazující umístění streptomycet na těle mravenců. Měřítka představuje 100 μ l (upraveno podle Currie *et al.* 1999).

Další oblastí interakce streptomycet s jinými druhy živočichů je interakce s obratlovci. Většina druhů streptomycet je nepatogenní, nacházející se na těle některých zvířat, dokonce i v jejich trusu (Ohta a Ikeda 1978; Moore *et al.* 1988; Cao *et al.* 2012). V roce 2017 Nicholls *et al.* zmínil případ dermatitidy psa, kde na základě sekvence 16S RNA odhalen druh *Streptomyces cyaneus* jako původce tohoto onemocnění, jež se projevovalo vznikem hnisajících vředů a lézí (Nicholls *et al.* 2017).

Streptomycety interagují i s člověkem, kolonizují lidskou kůži nebo například respirační systém. V České republice existuje unikátní sbírka nepatogenních izolátů streptomycet pocházejících z klinických vzorků lidských plic, avšak konkrétní dopad

těchto streptomycet na lidské zdraví je zatím neznámý (Herbrik 2019). Avšak vedle nepatogenních streptomycet existují i patogenní, pro člověka nebezpečné. Jedněmi z nejznámějších patogenních druhů jsou *Streptomyces somaliensis* a *Streptomyces griseus* způsobující onemocnění zvané mycetom. Mycetom je chronické granulomatózní onemocnění kůže způsobené houbami nebo aktinomycetami, přičemž infekce aktinomycetami je mnohem více agresivní a destruktivní (Reinke *et al.* 1986). Není znám žádný přenašeč či živočišný rezervoár. Projevuje se otoky a lézemi podkožních tkání, nejčastěji nohou. Při neléčené formě se může infekce dostat až do kostí. Toto onemocnění je nejrozšířenější v tropických a subtropických oblastech, nevíce případů je hlášeno ze Súdánu, Mexika a Indie (Hassan *et al.* 2001; Zijlstra *et al.* 2016). Mycetom je však jeden z mála případů, kdy je bakterie z rodu *Streptomyces* známa jako přímá příčina nemoci. Obvykle jsou taková onemocnění spíše vzácná. Častějšími případy jsou infekce streptomycetami u imunodeficientních pacientů, například pacientů s HIV (Dunne *et al.* 1998).

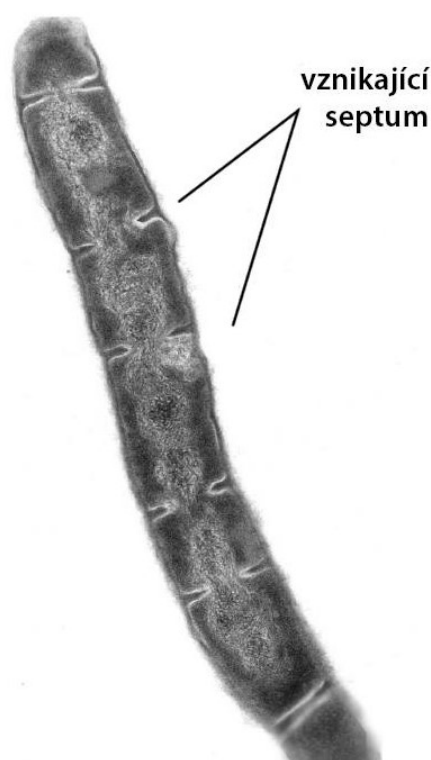
3.1.1 Způsob života

Charakteristickým rysem streptomycet je tvorba vegetativního vícejaderného mycelia, které může na první pohled připomínat nižší houby. Tvorba mycelia je pro půdní bakterie jako jsou streptomycety velmi výhodnou vlastností. Díky myceliu mohou streptomycety efektivně prorůstat půdou a vzduchovými prostory v ní, tím pádem mohou interagovat mezi sebou nebo s jinými mikroorganismy a jejich růst není omezen překážkami ve formě půdní matrice (Schäfer *et al.* 1998; Vetsigian *et al.* 2011).

Životní cyklus streptomycet začíná sporogenezí – procesem, při kterém spora vzniká (= sporulace) a dozrává. Jedná se o odpověď na stres, který je způsoben především vyčerpáním živin. Po nastolení vhodných podmínek začne spora klíčit (= germinace), čímž je zároveň iniciován životní cyklus streptomycet (Miguélez *et al.* 1999; Chater *et al.* 2010). Spora prorůstá a dochází k polárnímu růstu na hrotech (růstových vrcholech) hyf (Jones a Elliot 2018). Za tento jev je zodpovědný tzv. polarisom, multiproteinový komplex, který posiluje tvorbu peptidoglykanu právě v hrotech hyf (Fuchino *et al.* 2013).

Takto dojde k vytvoření husté sítě hyf, která přechází ve vegetativní substrátové mycelium. To slouží mimo jiné i k ukotvení streptomycet v substrátu. Jistá část mycelia lyzuje (dojde k programované buněčné smrti) a jeho obsah je využit jako náhrada

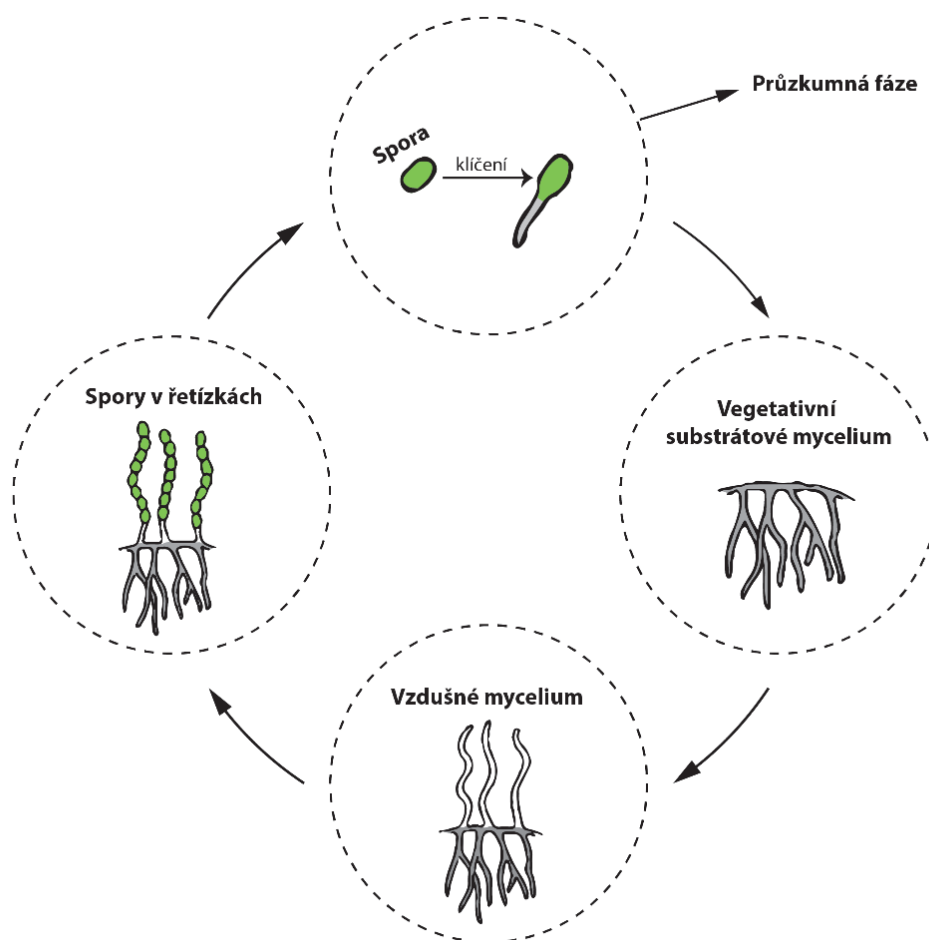
chybějících živin. Právě v této fázi životního cyklu se aktivuje též bohatý sekundární metabolismus streptomycet, dochází k produkci celé řady bioaktivních látek, nejčastěji antibiotik, fungicidních látek a pigmentů. Antimikrobiální metabolity slouží jako obrana před dalšími organismy, které také usilují o získání živin (Manteca a Sanchez 2010; Bobek *et al.* 2017). Zároveň dochází k diferenciaci tzv. vzdušného mycelia. „Sametový“ vzhled kolonií streptomycet je dán právě vznikem vzdušného mycelia, jehož hyfy jsou pokryty hydrofobní proteinovou vrstvou (Claessen *et al.* 2003; Manteca *et al.* 2007). Jak už název napovídá, vzdušné mycelium se ze substrátového mycelia prodlužuje dále do výšky, do vzduchu. Dochází ke tvorbě sept (obr. 3) a vzniku jednojaderných kompartmentů, které se diferencují a dávají tak vzniknout sporám, které jsou propojeny a vytváří tzv. řetízky (Chater 1993; Manteca a Sanchez 2010). Tyto dormantní buňky přetrvávají tak dlouho, dokud nejsou nastoleny vhodné podmínky pro jejich opětovné vyklíčení. Tímto je vývojový cyklus streptomycet uzavřen.



Obr. 3 Fotografie z transmisního elektronového mikroskopu zobrazující vznik sept ve vzdušném myceliu *S. coelicolor* (upraveno podle Flärdh 2003).

Streptomycety se ale od tohoto klasického schématu, skládajícího se z tří morfologicky odlišných vývojových fází (vegetativní substrátové mycelium, vzdušné mycelium, spory), mohou odchýlit (obr. 4). Fáze, kdy buňky vegetativního mycelia zaujmou nevětvenou vláknitou konformaci, se nazývá „průzkumná“ („explorer cells“),

kteřou poprvé v roce 2017 pojmenovala Jones *et al.* na příkladu interakce *Streptomyces venezuelae* a *Saccharomyces cerevisiae*. V této fázi mohou streptomycety rychle prozkoumávat živé i neživé povrchy tzv. „průzkumným růstem“, přičemž buňky se rychle pohybují a rozrůstají. Připomínají vzdušné hyfy a mikroskopickým pozorováním bylo odhaleno, že tyto buňky rostou jako nevětvená vegetativní vlákna, a to 10x rychleji než při klasickém vegetativním růstu (Jones *et al.* 2017). Tento jev se však netýká všech druhů streptomycet. Při pokusech na *Streptomyces coelicolor* a *Streptomyces griseus* se tento „průzkumný růst“ neprojevil, což také vysvětluje, proč tato životní fáze streptomycet nebyla doposud pozorována. Při genetickém screeningu kmenů, které nebyly tohoto průzkumného chování schopny, bylo odhaleno, že pro tento druh růstu jsou pravděpodobně esenciální geny kódující cytochrom bd oxidasu. Průzkumné buňky totiž při růstu zvyšují pH pevného média a cytochrom bd oxidázový komplex by mohl být důležitý při toleranci takto vysokého pH (Jones a Elliot 2018).



Popis obrázku na další straně

Obr. 4 Schéma životního cyklu streptomycet. Spora po nastolení vhodných podmínek vyklíčí. U některých druhů streptomycet může nastat tzv. „průzkumná fáze“, která je ale mezi streptomycetami spíše výjimkou. Obvykle po vyklíčení spory začne vznikat vegetativní substrátové mycelium. Po programované smrti buněk dojde k lyzi části vegetativních substrátového mycelia a začne vznikat mnohoaderné vzdušné mycelium. Následně dochází k tvorbě sept a vzniku jednojaderných pigmentovaných spor (upraveno podle Jones *et al.* 2017).

3.1.2 Genom bakterií rodu *Streptomyces*

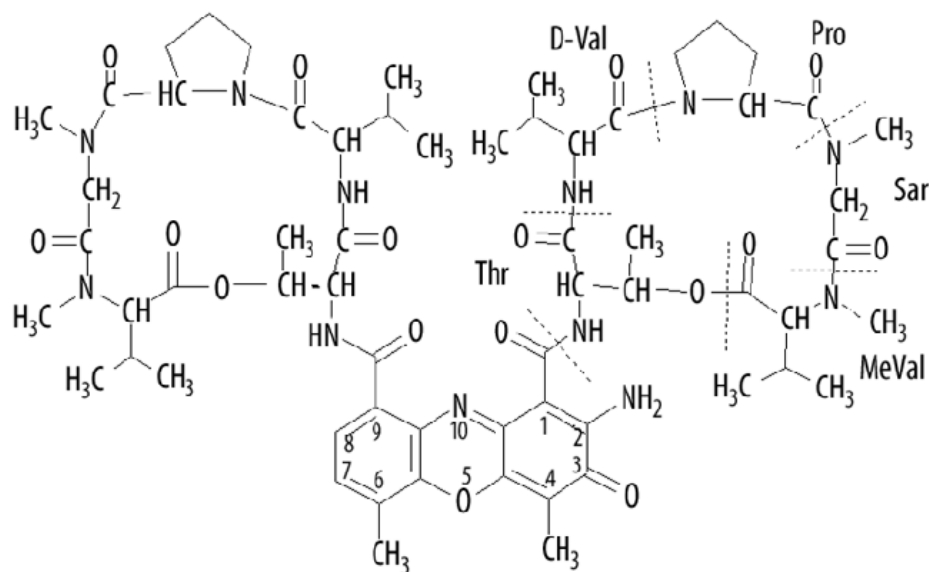
Chromozom streptomycet je lineární, o velikosti v průměru okolo 8-9 Mbp. Ve svém středu (přibližně polovina chromozomu) nese převážně esenciální geny pro buněčné dělení, DNA replikaci, transkripci, translaci atd., kdežto na okrajích ramen se nachází geny adaptivní, neesenciální jako například geny sekundárního metabolismu nebo hydrolytické exoenzymy (Bentley *et al.* 2002; Hopwood 2006). Replikace takového lineárního chromozomu probíhá klasicky obousměrně z centrálního *oriC* místa, ale replikační vidličky se nemohou potkat jako je to v případě kruhových chromozomů. Ukončení replikace mají na starost tzv. terminační proteiny nacházející se na volných 5'-koncích. Ty aktivují tvorbu „záplaty“ na 3'-mezeře, jež vzniká po odstranění RNA primeru z posledního Okazakiho fragmentu na opožďujícím se vlákně (Hopwood 2006). DNA streptomycet je bohatá na G-C páry bází, které činí 66 až 73 % z celkové DNA (Kämpfer *et al.* 2006).

3.3 Sekundární metabolity

Sekundární metabolity jsou produkty sekundárního metabolismu, tedy sloučeniny, které nejsou pro mikroorganismus esenciální, tzn., nejsou zapojeny v procesu růstu nebo rozmnožování (Běhal 2000). Exprese genů sekundárního metabolismu, které se obecně dle příslušnosti k biosyntéze určitého metabolitu na chromozomu soustřeďují do genových shluků (BCG, biosynthetic gene clusters) je obecně pod kontrolou různých druhů regulačních proteinů, přičemž některé jsou přítomny pouze v aktinomycetách a mohou být aktivovány jak vnějšími, tak vnitřními signálními molekulami. Sekundární metabolismus streptomycet je zdrojem bioaktivních látek s antibiotickými účinky či jinými léčivými vlastnostmi. Je nejaktivnější při vzniku vzdušného mycelia na pevném médiu a při přechodu do stacionární fáze při kultivaci v tekutém médiu (Bibb 2005; Procópio *et al.* 2012). Většina druhů streptomycet má schopnost syntetizovat celou řadu biologicky aktivních látek. Jedná se jak o antibiotika, tak o antifungální látky, herbicidy,

pesticidy, imunosupresivní látky, kancerostatika, anti-parazitické přípravky a enzymové inhibitory (Běhal 2000; Avignone-Rossa *et al.* 2013; Nandhini a Selvam 2013). Tyto látky jsou často toxické i pro samotné streptomycety, proto v sobě streptomycety obsahují mechanismy, které je před jejich působením chrání. Jedním z nich je například sestavení exportního systému, jenž předchází samotné biosyntéze těchto látek anebo ji doprovází. Dalším příkladem může být produkce antibioticky neaktivního prekursoru, který indukuje u streptomycet rezistenci. Bohužel streptomycety jsou zároveň zdrojem rezistence vůči antibiotikům i pro jiné patogenní druhy bakterií, jež rezistenci získávají pomocí horizontálního přenosu genetické informace (Hopwood 2007; Tahlan *et al.* 2007).

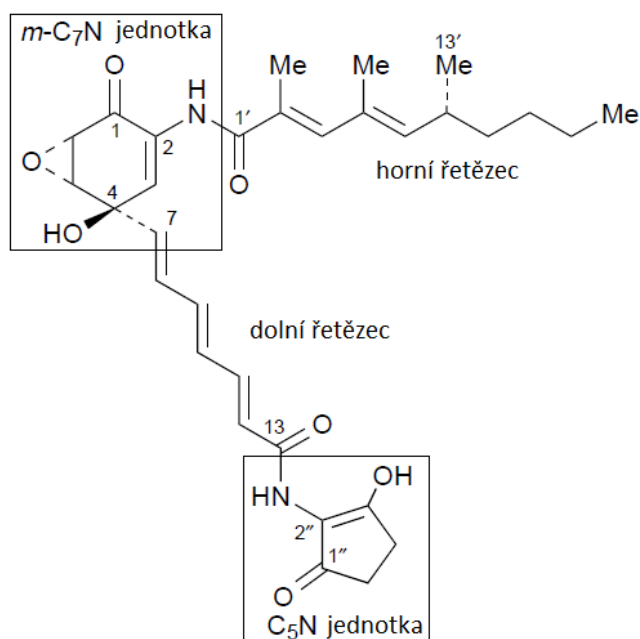
Dvě třetiny známých antibiotik jsou produkovány právě streptomycetami, přičemž většina je používána přímo pro lékařské účely (Běhal 2000; Khatib *et al.* 2016). Prvním izolovaným antibiotikem produkováným streptomycetami byl aktinomycin D (známý též jako daktinomycin; obr. 5), objev byl publikován Waksmanem a Woodruffem roku 1940. Aktinomycin D patří do skupiny látek zvané aktinomyciny, což jsou barevné (oranžové až červené) metabolity streptomycet, které i přes svou vysokou toxicitu našly roku 1957 uplatnění jako chemoterapeutika. Podávají se v netoxických dávkách samostatně nebo v kombinaci např. s antracykliny nebo s radioterapií a díky svým protinádorovým účinkům je možno aktinomyciny využít při léčbě Wilmsova tumoru, tumorů měkkých tkání anebo při léčbě rakoviny placenty (Hollstein 1974; Koba a Konopa 2005). Počet nově objevených antimikrobiálních látek produkováných rodem *Streptomyces* narůstal od tohoto okamžiku každým rokem téměř exponenciálně, přičemž maximálního vzestupu tyto objevy dosáhly v 70. letech. Poté počet nově objevených antibiotik opět prudce poklesl (Watve *et al.* 2001).



Obr. 5 Vzorec aktinomycinu D (upraveno podle Koba a Konopa 2005).

3.3.1 Manumyciny

Manumyciny jsou účinné bioaktivní látky působící proti gram-pozitivním bakteriím a plísním, naopak nepůsobí proti gram-negativním bakteriím a kvasinkám (Thiericke *et al.* 1990). Mají silné protizánětlivé a kancerostatické účinky. Roku 1963 byla objevena sloučenina pojmenována jako manumycin A, jež dala název i celé skupině antibiotik – manumycinům. Manumycin A je produkován *Streptomyces parvulus* a obsahuje dva nenasycené uhlíkaté řetězce (dolní a horní) připojené k unikátnímu šestičlennému kruhu odvozenému od kyseliny aminohydroxybenzoové, nazývaného mC_7N jednotka (2-amino-4-hydroxycyklohex-2-enon). Horní řetězec je k mC_7N jednotce připojen přes dusík a spodní řetězec je připojen přes C7 uhlík. C_5N jednotka (2-amino-3-hydroxycyklopent-2-enon) je připojena k dolnímu řetězci (obr. 6). mC_7N jednotka je spolu s dolním a horním postranním řetězcem charakteristická pro všechny zástupce skupiny manumycinů, přičemž nejvíce strukturních variací můžeme najít v horním řetězci (Stattler *et al.* 1998). Dolní postranní řetězec je méně variabilní, obvykle se jedná o trieny v *trans* uspořádání (Petříčková *et al.* 2014).



Obr. 6 Vzorec manumycinu A (upraveno podle Sattler *et al.* 1998).

3.3.1.1 Účinky manumycinů

Většina manumycinů byla objevena pomocí genetického screeningu (viz dále kapitola 3.3.2). Tento vědecký zájem je zapříčiněn schopností manumycinů vykazovat nejrozumnější biologické aktivity.

Antibakteriální působení manumycinů je jejich typickou vlastností. Tuto schopnost však vykazují pouze manumyciny *typu I* (viz dále kapitola 3.3.1.3) jako například manumycin A, E, F, G, asukamycin, kolabomycin, alisamycin, nisamycin atd., a to pouze proti gram-pozitivním bakteriím. Tato vlastnost souvisí nejspíše s epoxidovou skupinou na uhlících C5/C6 (oxiran), kterou manumyciny *typu II* nemají a tím pádem nevykazují žádné antibakteriální účinky (Hu 2000). U manumycinů E, F a G byla pozorována slabá aktivita také proti *E. coli* (Shu *et al.* 1994).

Manumyciny mají řadu enzym-inhibičních aktivit – například inhibují Ras farnesyltransferasu tak, že silně a selektivně kompetují s jejím substrátem, farnesylpyrofosfátem (FPP). Ras farnesyltransferáza přenáší farnesylovou skupinu na Ras proteiny, díky které se stávají funkčními (jedná se o posttranslační modifikaci). Ras proteiny jsou proteiny s nízkou molekulovou hmotností, jež váží GTP a spouští či regulují procesy vedoucí k buněčné proliferaci. Mutace *ras* genů způsobující přílišnou aktivitu Ras proteinů je jednou z nejběžnějších genetických abnormalit při onemocnění

rakovinou u člověka. Kompeticí manumycinů s FPP dochází k antiproliferačním účinkům v buňkách nádoru (Zhou *et al.* 2003). Tato protinádorová vlastnost byla objevena roku 1993 u manumycinu A Harou *et al.* Kompeticí umožňuje epoxidová skupina na *mC₇N* jednotce manumycinu A a přítomnost horního řetězce, který je strukturně podobný FPP (Hara *et al.* 1993). Takto manumyciny působí při nesčetných onemocněních rakovinou, například při hepatocelulárním karcinomu anebo při rakovině prostaty (Li *et al.* 2014). Manumyciny působí protinádorově i bez jejich zapojení při inhibici enzymů. Při onemocnění kolorektální rakovinou inhibují manumyciny proliferaci nádorových buněk tak, že způsobují jejich apoptózu indukcí produkce reaktivních kyslíkových radikálů (ROS). Nahromadění ROS je způsobeno sníženou fosforylací fosfatidylinositol 3-kinázy (PI3K) a proteinkinázy B neboli AKT (z angl. *thymomas of AKR mice*). Tato PI3K-AKT intracelulární signální dráha je zapojena při regulaci buněčného cyklu, a tím pádem při vývoji rakovinných buněk. Vznik ROS vede ke dvěma na sobě nezávislým jevům ústícím v apoptózu rakovinné buňky: ROS způsobují dvouvláknové zlomy DNA, také ale pomocí ROS dochází k expresi kaspázy-9 v lidských CRC (z angl. colorectal cancer cell line) buňkách. Kaspáza-9 je hlavní iniciátor kaskádovité apoptické dráhy, která je aktivována poruchou mitochondrií. Kaspáza-9 aktivuje kaspázu-3, která následně aktivuje další řadu kaspáz vedoucích k inaktivaci DNA opravného enzymu PARP (poly(ADP-ribóza) polymerázy; Zhang *et al.* 2016).

Manumyciny mají rovněž i protizánětlivé a imunosupresivní účinky. Manumycin A inhibuje expresi mRNA prozánětlivých genů a inhibuje uvolňování interleukinů IL-1beta, IL-6 a IL-8 z makrofágů (Cecrdlova *et al.* 2015). IL-1beta je izoformou interleukinu 1 (IL-1), jež je produkován aktivními monocyty a makrofágy a během onemocnění stimuluje zánětlivou reakci. Produkován je v inaktivní formě a pro jeho aktivaci je potřeba interleukin-1beta konvertující enzym (ICE). Některé manumyciny (manumycin A, manumycin B a *ent*-Alisamycin) v *in vitro* podmínkách prokázaly schopnost aktivitu ICE inhibovat (Tanaka *et al.* 1996).

3.3.1.2 Biosyntéza manumycinů

Biosyntéza manumycinů byla nejlépe prostudována na biosyntéze asukamycinu (obr. 7) produkovaném druhem *Streptomyces nodosus* subsp. *asukaensis*.

karboxylové kyseliny anebo k němu může být připojena C₅N jednotka (Petříčková *et al.* 2014).

Biosyntéza polyketidů

Polyketidové řetězce jsou součástí mnoha bioaktivních látek jako například antibiotik, kancerostatik, antiparazitik nebo imunosupresorů (Fischbach a Walsh 2006). Polyketidy tvoří velmi rozmanitou skupinu přírodních látek, které jsou syntetizovány z krátkých acetyl-CoA jednotek pomocí polyketidsynthas (PKS). Tyto syntázy jsou charakteristicky uspořádány do modulů a vyvinuly se pravděpodobně z enzymů primárního metabolismu mastných kyselin (Hopwood 1997; Austin a Noel 2002; Chen a Du 2015). Obecně se PKS moduly skládají z jednotlivých domén, které jsou zodpovědné za výběr a zpracování jednotlivých stavebních bloků výsledné molekuly. Pro samotný výběr a aktivaci požadovaného substrátu, jenž se má stát součástí polyketidového řetězce, jsou důležité acyl-transferázové domény (AT), které následně aktivovaný substrát předají na acyl-přenášející protein (acyl carrier protein, ACP). Ketosyntázová doména (KS) umožňuje dekarboxylaci a kondenzaci substrátu a prodlužujícího se polyketidového řetězce. Tato kondenzace se děje tzv. Claisenovou kondenzací, kdy vzniká vazba mezi dvěma uhlíky, respektive mezi α -uhlíkem vznikajícího polyketidového řetězce a mezi karbonylem ACP nesoucí substrát (Chen a Du 2015). Po ketosyntázové doméně nastupují na řadu tzv. *tailoring* domény, které mají za úkol upravit výslednou molekulu do její finální podoby. Jedná se o ketoreduktasu (KR), dehydrogenasu (DH) a enolreduktasu (ER; Fischbach a Walsh 2006).

Polyketidsyntázy se dělí do několika skupin na základě organizace jejich domén. PKS *typu I* se skládají z velkého polypeptidového komplexu modulů. Na nich se nachází domény, které jsou řazeny postupně podle toho, jak jsou v jednotlivých prodlužovacích krocích potřeba, přičemž každá je využita jen jednou. Nacházejí se v houbách nebo bakteriích. PKS *typu II* jsou tvořeny samostatnými proteiny, přičemž každý protein má odlišnou úlohu při syntéze polyketidu. Domény jsou využívány při syntéze opakovaně a tvoří proteinové komplexy. Obvykle se tyto PKS nachází v bakteriích a jejich typickými produkty jsou atomatické polyketidy (Zhang a Tang 2009; Chen a Du 2015). Nemají AT domény. PKS *typu III* mají jednoduchou strukturu – jsou tvořeny homodimerem identických KS domén. Přijímají acetyl-CoA ve formě thioesteru přímo namísto prostřednictvím ACP (Austin a Noel 2002). PKS *typu III* produkují rovněž aromatické sloučeniny a vyskytují se hlavně v rostlinách (Chen a Du 2015).

Biosyntéza mC_7N jednotky

Chemické sloučeniny stejného typu jako mC_7N jednotka v případě jiných antibiotik obvykle vznikají cestou biosyntézy kyseliny šikimové, ovšem pro manumyciny je typický jiný způsob (Thiericke *et al.* 1990). Prekurzorem mC_7N jednotky je 3-amino-4-hydroxybenzoová kyselina (3,4-AHBA), jejíž část pochází z intermediátu Krebsova cyklu (L-aspartát-4-semialdehyd) a část z metabolismu trios (dihydroxyaceton či dihydroxyfosfát; Hu *et al.* 1997). Dvě molekuly kyslíku v molekule mC_7N jednotky pochází z atmosférického kyslíku a jsou do molekuly zapojeny pomocí oxygenáz (Thiericke *et al.* 1990). První se kyslík připojuje k C4 uhlíku, což dává vzniknout 4-hydroxyprotoasukamycinu. Dále na uhlíku C5/C6 vzniká epoxidová skupina. Na základě oxidací molekuly mC_7N můžeme proto rozdělit manumyciny na dva typy – *typ I* vypadá tak, jak bylo popsáno čili nese epoxidovou skupinu na uhlících C5/C6 (oxiran). Manumycinu *typu II* vznikají enzymatickou nebo neenzymatickou redukcí epoxidu na C5/C6 za vzniku hydroxyethylenu (Hu 2000; Rui *et al.* 2010; Petříčková *et al.* 2014).

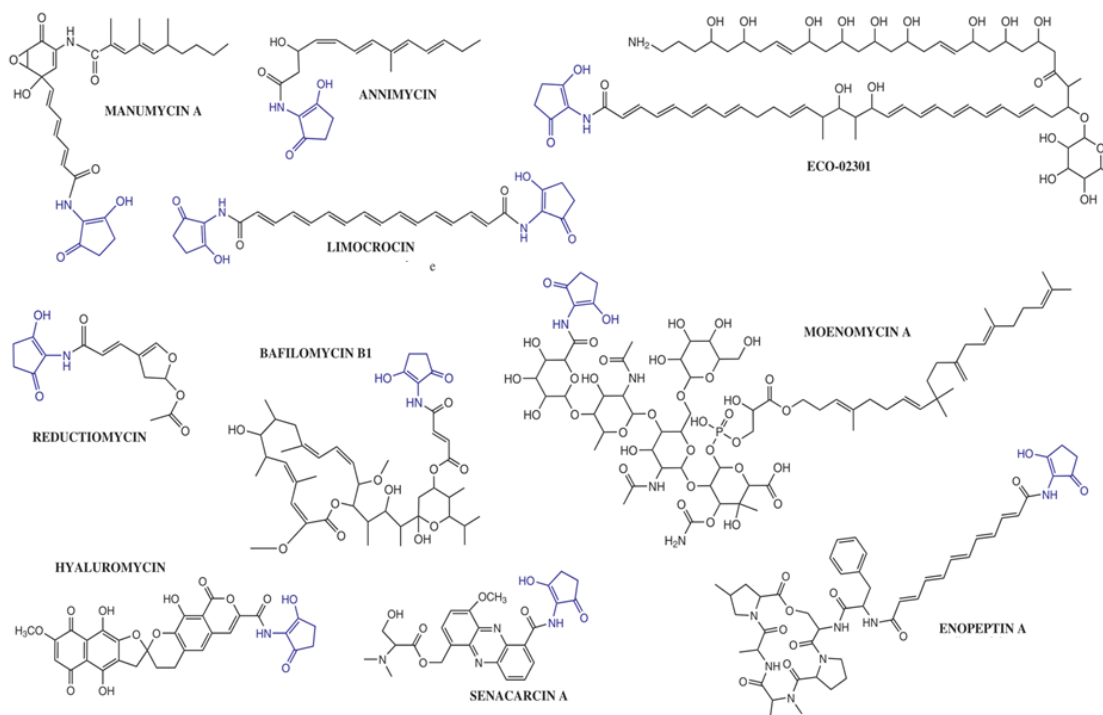
Biosyntéza postranních řetězců a C_5N jednotky

Horní i dolní řetězec vzniká polyketidovou syntézou (Petříčková *et al.* 2014). Horní řetězec vzniká prodlužováním startovní molekuly jako je například acetyl-CoA, isopropyl-CoA nebo cyklohexylkarbonyl-CoA. Manumyciny se na základě stavby horního řetězce mohou rozdělit na manumyciny *typu A* (horní řetězec je lineární) a na manumyciny *typu B* (horní řetězec je větvený). Horní řetězec je velmi variabilní napříč všemi manumyciny a obecně je tvořen nenasycenými mastnými kyselinami, jež nesou jednu až čtyři dvojné vazby (Thiericke *et al.* 1990; Hu 2000; Rui *et al.* 2010). Manumyciny *typu B* používají jako startovní molekulu acetyl-CoA, jež prodlužují pomocí methylmalonyl-CoA anebo malonyl-CoA. Manumyciny *typu A* používají různé startovní molekuly. V případě asukamycinu je startovací molekulou cyklohexylkarbonyl-CoA (CHC-CoA), který vzniká z kyseliny šikimové. Následuje jeho kondenzace se třemi molekulami malonyl-CoA. Jako startovní molekula ale mohou být využity například ještě dekarboxylované nebo deaminované větvené aminokyseliny (Hu 2000).

Startovní molekula pro dolní řetězec je 3,4-AHBA čili dolní řetězec vzniká zároveň s biosyntézou mC_7N jednotky. Dolní řetězec vzniká pomocí PKS *typu II* (Rui *et al.* 2010). Tento systém obvykle bakterie využívají k tvorbě aromatických (cyklických) polyketidů, ale v případě manumycinů se PKS *typu II* podílí na syntéze lineárního řetězce (Hopwood 1997; Thiericke *et al.* 1990). 3,4-AHBA je vázána na ACP (acyl carrier

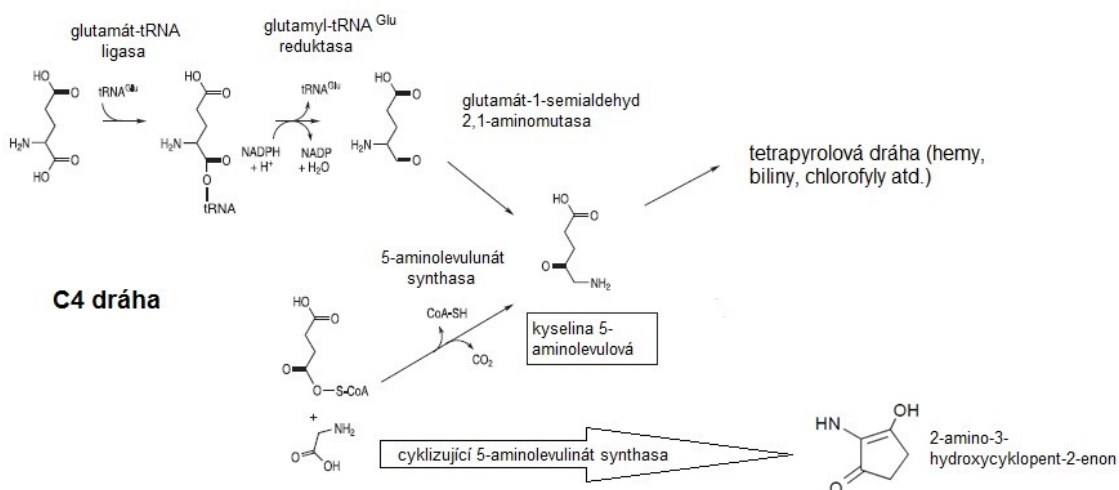
protein) a je přenesena ke ketosyntáze, která má za následek kondenzaci 3,4-AHBA s malonyl-CoA, rovněž připojeným na ACP. Počet kondenzací odpovídá tomu, zdá se má jednat o výsledný trien nebo tetraen. V procesu je zapojena ještě ketoreduktáza a dehydrogenáza, kdy výsledkem je dvojná vazba (Rui *et al.* 2010).

Dolní řetězec může zůstat v podobě karboxylové kyseliny anebo k němu může být připojena C₅N jednotka, jež vzniká nezávisle na zbytku molekuly. Látky obsahující C₅N jednotku jsou uvedeny na obrázku č. 9. Jejím prekurzorem je kyselina 5-aminolevulová (5-ALA). Ta je intermediátem primárního metabolismu většiny organismů a zároveň prekurzorem tetrapyrolové dráhy dávající vzniknout hemům, bilinům nebo chlorofylům. Pro účely formace manumycinů vzniká kondenzací glycinu a sukcinyl-CoA (tzv. C₄ dráha) pomocí enzymu 5-aminolevulinát syntázy (ALAS), respektive cyklizující 5-aminolevulinát syntázy (cALAS; viz dále kapitola 3.3.1.3). 5-ALA může vznikat ještě jiným způsobem, tzv. C₅ dráhou (obr. 10), jež je vývojově starší. Taková 5-ALA je odvozena z glutamátu a neslouží jako prekurzor C₅N jednotky, ale zůstává zapojena pouze v primárním metabolismu, přičemž se obvykle přítomnost obou drah v jednom organismu navzájem vylučuje (Yang a Hooper 1995; Petříček *et al.* 2006; Zhang *et al.* 2010). Výjimkou jsou ale některé druhy streptomycet, které využívají dráhy obě – C₅ dráhu pro primární metabolismus 5-ALA a C₄ dráhu pro biosyntézu C₅N jednotky (Petříček *et al.* 2006). Funkce obou enzymů (cALAS pro C₅N jednotku a ALAS pro 5-ALA) se nekříží díky evoluční změně v aktivitě cALAS (obr. 10). C₅N jednotka je nakonec ATP-dependentní amid syntázou připojena na konec dolního řetězce (Thiericke *et al.* 1990).



Obr. 9 Příklady bioaktivních látek obsahujících C₅N jednotku. Manumycin A působí protizánětlivě a také protinádorově stejně jako senacarcin A. Annimycin – inhibuje diferenciaci u aktinomycet a některé jeho deriváty mají antibiotickou aktivitu. ECO-02301 má protiplísňové účinky. Limocrocin inhibuje reverzní transkriptázy. Reductomycin má antivirové účinky. Moenomycin A a enopeptin A vykazují antibakteriální účinky. Hyaluromycin je inhibitorem hyaluronidázy (obrázek poskytnut s dovolením Mgr. Kateřiny Petříčkové, Ph.D.).

C5 dráha



Obr. 10 Porovnání C5 a C4 dráhy možné biosyntézy kyseliny 5-aminolevulové a C₅N jednotky (2-amino-3-hydroxycyklopent-2-enonu; upraveno podle Petříček *et al.* 2006).

3.3.1.3 Cyklizující aminolevulinát syntáza

Přímo při formaci a připojení C₅N jednotky k dolnímu řetězci manumycinů jsou zapojeny tři enzymy: cyklizující aminolevulinát syntáza (cALAS), amid syntáza (AMS) a aminolevulinát-CoA ligáza (ALL). Tyto enzymy jsou kódovány geny, které se vždy nachází v těsné blízkosti v příslušném genovém klastru kódujícím příslušné antibiotikum. Operon pro tyto tři enzymy je ve většině případů konzervovaný napříč všemi producenty metabolitů s C₅N jednotkou. Nicméně producenty C₅N jednotky můžeme rozdělit na dvě skupiny – s kongruentním a divergentním uspořádáním trojice genů. Zástupci první skupiny produkují jednoduché lineární polyketidy a reduktomycin a uspořádání genů v operonu je v klasickém konzervovaném pořadí: *ams-als-all* (obr. 11, A). Druhá skupina je tvořena zástupci producentů komplexních sloučenin, například makrolidů nebo polyketidů obsahujících cukry. Jedná se o producenty moenomycinů a bafilomycinů. Gen pro cALAS (*als*) se nachází v opačné orientaci ležícím před operonem *ams-all* (obr. 11, B; Petříčková *et al.* 2015).



Obr. 11 Orientace operonů kódujících formaci a připojení C₅N jednotky k dolnímu řetězci manumycinů (upraveno podle Petříčková *et al.* 2015).

Cyklizující aminolevulinát syntáza je velmi komplexní enzym – nejen, že se podílí na kondenzaci glycinu a sukcinyl-CoA, ale rovnou jejich produkt, kyselinu 5-aminolevulovou, cyklizuje (Zhang *et al.* 2010). Jedná se o unikátní, novou vlastnost tohoto enzymu, která byla nabyta evolucí z klasické ALAS konzervativními záměnami v sekvenci aminokyselin (obr. 12).

forward

1 MDISSSMDFFVR--LARETGD--RKREFLEGRKAGRFPAASTSN-----GEISTWCSNDYLGMCQHDPVLDAMKRSVDEYGGSGGSRNTGGTNHFFSV *S. ghanaensis* ATCC14672
1 --MNHYLELFSTR--NMGEAGAPDAKREFLEGLRAGKFFPAARSLR--DGVTSSEISVWCSNDYLGMCQHPLVLAATREALDEYAGSGGSRNIGGNTNHYHV *S. lohii* ATCC BAA-1276
1 --MNQYLEIFSTR--RMREGGSPKAERFLEISRIAGKFFPAARSP--GGAAAEVSVWCSNDYLGMCQHPLVLAATREALDEHAGSGGSRNIGGNTNHYHV *K. setae* KM-6054
1 --MNLHLESYSYGVTAKEALAE--RRREFLEIGRRSGHFPASARQ--DGVDSQISVWCSNDYLGMCQNPQVIEAMKKTIDTHGVSGGSRNIGGNTNHYHV *S. aizunensis* NRRL B-11277
1 --MTLHVDLFSQ--EMKEFAH--HKRQFLEIGRNAGRFPSAVARQGHGDTVEISVWCSNDYLGMCQNPVSIEAMKEAIDAFGAGSGGSRNIGGNTNHYHV *S. aureus* SOK1/5-04
1 --MTNRHMDFFVR--EMADFGP--RKREFLEIGRRAGLFPSAVARQGPDTGAEISVWCSNDYLGMCQNPVLEAIKDAVDAFGAGSGGSRNIGGNTNHYHV *Sac. espanaensis* DSM44229
1 --MNKHLDDFFAR--EMEEFGA--RRREFLEIGRRAGRFPSAVARQGGQDGTVEISVWCSNDYLGMCQNPVLEAVKNAVDAFGAGSGGSRNIGGNTNHYHV *S. nodosus* ssp. *asukaensis*
1 --MNRLLDHFAG--ELEALGG--QRRDFLEIGRRAGRFPSALARLQDAPSDVEISVWCSNDYLGMCQHPSVLEAAKNAVDAFGAGSGGSRNIGGNTNHYHV *S. parvulus* DSM40722
1 --MNRLLDHFAG--ELEALGG--QRRDFLEIGRRAGRFPSALARLQDAPSDVEISVWCSNDYLGMCQHPSVLEAAKNAVDAFGAGSGGSRNIGGNTNHYHV *S. griseoaurantiacus* M045
1 ---MDYNLALD-KAIQKLHDEGRTYTFIDIEREKGAFFPKAQ-WNRPDGGKQDITVWCGNDYLGMCQHPSVLEAAKNAVDAFGAGSGGSRNIGGNTNHYHV *R. capsulatus* SB1003
128 --YVFSYDQFFR-DKIMEKKQDHTYRVFKTVNRWADYPPAQHFSEASVASKDVSVWCSNDYLGMSRHPQVLQATQETLQRHGVGAGGSRNIGGNTNHYHV *H. sapiens*

reverse

191 ALLAEIAGLAKRYGAVTFLDEVHAGVMYGPQGAGIAARDGVHCEFTVMVMTLAKAFGMTGGYVAGPAVLMDAVRARARSFVFTTALPPAVAAGALAAVRH *S. ghanaensis* ATCC14672
195 APLAEIARIARHGAMTFLDEVHAGVMYGPPEGAGIAGLGIADFTVIMGTLAGKFGTGGYVAGPAELVDVAVRGLSRPFIFTTALPPAVAAGALAAVRH *S. lohii* ATCC BAA-1276
195 APLAEIARIARKYGAMTFLDEVHAGVMYGPPEGAGIAGLGIADFTVIMGTLAGKFGTGGYVAGPAELVDVAVRGLSRPFIFTTALPPAVAAGALAAVRH *K. setae* KM-6054
195 APLAEIARLARRYDATTYFLDEVHAGVMYGPQGAGIAREGIADFTVIMGTLAGKFGTGGYVAGPAALVDVAVRGLSRPFIFTTALPPAVAAGALAAVRH *S. aizunensis* NRRL B-11277
195 APLAEIADIAKRYGASTFLDEVHAGVMYGPPEGAGIAREGIADFTVIMGTLAGKFGTGGYVAGPAALVDVAVRGLSRPFIFTTALPPAVAAGALAAVRH *S. aureus* SOK1/5-04
196 APLAQIAEVSHRYHATTFLDEVHAGVMYGPQGAGIAREGLADFTVIMGTLAGKFGTGGYVAGPAALVDVAVRGLSRPFIFTTALPPAVAAGALAAVRH *Sac. espanaensis* DSM44229
195 APLAEIARLARRHATTFLDEVHAGVMYGPQGAGIAREGIADFTVIMGTLAGKFGTGGYVAGPAALVDVAVRGLSRPFIFTTALPPAVAAGALAAVRH *S. nodosus* ssp. *asukaensis*
195 APLAEFADIAEFHAAFTFLDEVHAGVMYGPQGAGIAREGIADFTVIMGTLAGKFGTGGYVAGPAALVDVAVRGLSRPFIFTTALPPAVAAGALAAVRH *S. parvulus* DSM40722
195 APLAEFADIAEFHAAFTFLDEVHAGVMYGPQGAGIAREGIADFTVIMGTLAGKFGTGGYVAGPAALVDVAVRGLSRPFIFTTALPPAVAAGALAAVRH *S. griseoaurantiacus* M045
195 GPTKEICDIADFEALTYIDEVHAGVMYGPQGAGIAREGLADFTVIMGTLAGKFGTGGYVAGPAALVDVAVRGLSRPFIFTTALPPAVAAGALAAVRH *R. capsulatus* SB1003
325 CPLEELCDVSHQYGAFTFLDEVHAGVLYGSRGAGIGEDGIMHKIDITSGTLKAFGCVGGYIASTRDLVDMVRSYAAGFIPTTSLPMMVLSGALESVRL *H. sapiens*

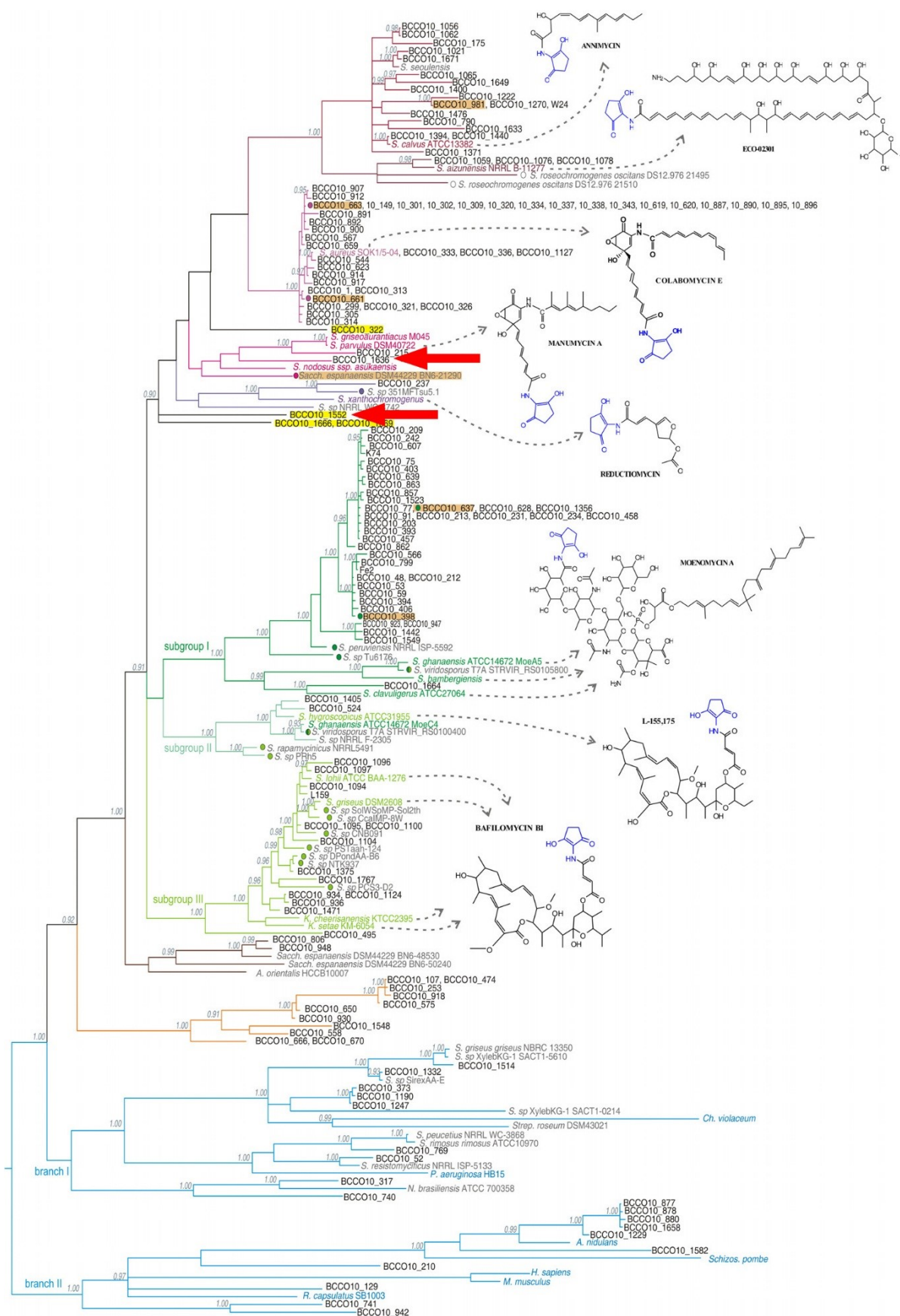
291 LRSGDEE--RRRPAENARITGLRLRERDIPVLDRSPIVPVLVGEDRMCKRMSALPLERHGAYVQAIADAPSVPAGEEILRIAPSAVHETEEIHRFVDALD *S. ghanaensis* ATCC14672
295 LRSTSEE--RDRLRENARITGLRLRERDIPVLDRSPIVPVLVGEDRMCKRMSALPLERHGAYVQAIADAPSVPAGEEILRIAPSAVHETEEIHRFVDALD *S. lohii* ATCC BAA-1276
295 LRSTSEE--RDRLHANARITGLRLRERDIPVLDRSPIVPVLVGEDRMCKRMSALPLERHGAYVQAIADAPSVPAGEEILRIAPSAVHETEEIHRFVDALD *K. setae* KM-6054
295 LRNSDVE--RKVLAEANQILHRLLEADIPFISPDHSIVSAFIDGDETCQASRLLEFHHGIYVQINAPSVPLGQEIILRIAPSTVHGREDVENFAEALR *S. aizunensis* NRRL B-11277
295 LRSDSEE--RDRLRDNQILHRLLEADIPFISPDHSIVSAFIDGDETCQASRLLEFHHGIYVQINAPSVPLGQEIILRIAPSTVHGREDVENFAEALR *S. aureus* SOK1/5-04
296 LRSEVEE--RERLAANARITGLRLRERDIPFISPDHSIVSAFIDGDETCQASRLLEFHHGIYVQINAPSVPLGQEIILRIAPSTVHGREDVENFAEALR *Sac. espanaensis* DSM44229
295 LRASEGE--RTRLAANAGILHRLLEADIPFISPDHSIVSAFIDGDETCQASRLLEFHHGIYVQINAPSVPLGQEIILRIAPSTVHGREDVENFAEALR *S. nodosus* ssp. *asukaensis*
295 LRSEAE--RDRLAANAGILHRLLEADIPFISPDHSIVSAFIDGDETCQASRLLEFHHGIYVQINAPSVPLGQEIILRIAPSTVHGREDVENFAEALR *S. parvulus* DSM40722
295 LRSEAE--RDRLAANAGILHRLLEADIPFISPDHSIVSAFIDGDETCQASRLLEFHHGIYVQINAPSVPLGQEIILRIAPSTVHGREDVENFAEALR *S. griseoaurantiacus* M045
295 LKTAEGQRLKDAQCMHAKVLMRLKALGMPITDHGSHIVPVVIGDQSHIVSAFIDGDETCQASRLLEFHHGIYVQINAPSVPLGQEIILRIAPSTVHGREDVENFAEALR *R. capsulatus* SB1003
425 LKGEGBQALRRHQNRVNHMRQLMDRGLPVI PCPSHIIPVIRVGNALNSKLCDLLSKHGIVYQAINYHTVPRGEELLRLAPSPHHSPQMDFVEKLL *H. sapiens*

389 GIWSELGAARRV *S. ghanaensis* ATCC14672
393 GIWRELGVTRAGPHGSPGTDG *S. lohii* ATCC BAA-1276
393 GIWRELGVTRAREPRPAG *K. setae* KM-6054
393 GIWKEINPTATDRNMLS *S. aizunensis* NRRL B-11277
393 GIWQELDIPTEHTRGN *S. aureus* SOK1/5-04
394 GIWQELGIPGTGPTAG *Sac. espanaensis* DSM44229
393 GIWRDLGIPRAGRAGR *S. nodosus* ssp. *asukaensis*
393 GIWQELGIPRGGVRGA *S. parvulus* DSM40722
393 GIWQELGIPRGGVRGA *S. griseoaurantiacus* M045
395 LLWARCALNRAEASA *R. capsulatus* SB1003
525 LAWTAVGLPLQDVSAACNFCRRPVHFMELSEWERSYFGNMGPQVITYTA *H. sapiens*

Obr. 12 Porovnání aminokyselinových sekvencí pro cALAS (text černě) s klasickou ALAS standardních producentů – proteobakterie (*R. capsulatus*), člověk (text šedě, červený puntík). Na základě porovnání aminokyselinových sekvencí můžeme pozorovat změny v sekvenci cALAS oproti sekvencím klasických producentů ALAS, které pravděpodobně mohou souviset se schopností cALAS cyklizovat kyselinu 5-aminolevulovou. Aminokyselinové zbytky lišící se od klasické ALAS jsou zvýrazněny šedě a ty, jenž přímo souvisí s aktivitou enzymu, jsou zvýrazněny černým rámečkem. Šipky a tučně značené aminokyselinové zbytky označují zbytky přímo vázající substrát (upraveno podle Petříčková *et al.* 2015).

cALAS je kódovaná genem *als*, homologem genu *hemA*, a ten lze považovat za genetickou značku producentů látek s C₅N jednotkou. Díky ní mohou být tyto producenti identifikováni genetickým screeninem (Petříčková *et al.* 2015). Screening byl v roce

2015 proveden u cca 1500 izolátů streptomycet z rozmanitých biotopů celého světa. Bylo zjištěno, že sekvence genu pro cALAS koreluje s typem syntetizovaného metabolitu. Z přibližně 1500 izolátů streptomycet bylo na základě PCR s vhodně zvolenými degenerovanými primery určeno 14 % jako pozitivních na přítomnost genu *als*. Fragment odpovídající požadovanému produktu PCR měl velikost 519 bp. Ten byl následně osekvenován a na základě sekvence byl sestaven fylogenetický strom (obr. 13). Pro tuto práci z něj byly vybrány dva pozitivní izoláty – *Streptomyces monomycini* BCCO10 1552 a *Streptomyces capoamus* BCCO10 1636.



Obr. 13 Fylogenetický strom sestaven Petříčkovou *et al.* na základě porovnání nukleotidových sekvencí pro gen *als*. Sekvence genu pro cALAS souvisí s typem syntetizovaného

metabolitu. Jednotlivé větve jsou odděleny barevně – fialové značí producenty lineárních polyketidů a reduktomycinu, zelené značí producenty moenomycinů a bafilomycinů, modré značí kmeny s *als* geny primárního metabolismu. Hnědou a oranžovou jsou označeny samostatné větve bez žádné referenční sekvence. Individuální izoláty jsou zvýrazněny žlutě. Červenými šipkami jsou označeny kmeny použité pro tuto práci (upraveno podle Petříčková *et al.* 2015).

3.3.2 Hledání producentů nových bioaktivních látek

V předchozí kapitole byl zmíněn genetický screening izolátů streptomycet, na jehož základě byli vybráni producenti látek obsahujících C₅N jednotku. Z nich byly vybrány dva kmeny pro tuto práci. Genetické screeningové techniky jsou závislé na dobré znalosti genetiky biosyntetických drah a mají oproti tradičním fenotypovým screeningům jednu zásadní výhodu – lze jimi identifikovat i metabolicky neaktivní genové shluky, které lze dost často následnými vhodnými technikami aktivovat. Jsou též levnější a rychlejší. Nevýhodou je, že zachytávají i kmeny, u kterých byla sekundárně biosyntetická dráha poškozena díky mutacím a genetickým přestavbám, např. insercím a delecím účinkem integráz a rekombináz.

Hledání producentů nových zajímavých bioaktivních látek tedy nejčastěji probíhá uvedenými čtyřmi:

a) Tradiční techniky na základě hledání aktivity v *in vivo* testech

Tyto techniky již v dnešní době pro účely nalezení nových látek nejsou tolik účinné – často dochází k „nalezení“ již objevených látek, případně může být celý biosyntetický genový shluk (biosynthetic gene cluster; BGC) v laboratorních podmínkách neaktivní. Pro minimalizaci alespoň prvního případu (nalézání již objeveného) je možno hledat mezi streptomycetami izolovanými například z neobvyklých biotopů anebo přikročit k hledání aktivity mezi neobvyklými aktinomycetami, respektive mezi jinými rody, než je rod *Streptomyces* (Mishra *et al.* 2019). Lze je též úspěšně využít při screeningu aktivity namířené proti nově identifikovaným cílům, například pro vyhledávání imunomodulátorů nebo kancerostatik. Řada aktivních látek byla totiž při svém objevu v druhé polovině dvacátého století testována pouze na aktivity antibiotické.

b) Aktivace kryptických BGC v původním producentu

Jak už bylo zmíněno, takový BGC může být v laboratorních podmínkách neaktivní. Nicméně pokud se jedná o kryptický BGC, je možné jej aktivovat různými přístupy. Nejjednodušším způsobem je prostá změna média, ve kterém mikroorganismus kultivujeme. Malou změnou ve složení média můžeme dosáhnout velké nadprodukce hledaných látek, ale také může dojít k produkci úplně jiných, nových molekul (Bode *et al.* 2002). Dále může dojít k aktivaci kryptického BGC vystavením producenta stresu – hladověním na zdroj uhlíku nebo dusíku, kokultivací s patogenem (Onaka *et al.* 2011), osmotickým stresem, změnou pH média, přítomností těžkých kovů v médiu atd. Jako konkrétní příklad je možno uvést experiment, kdy přidáním scandia (Sc) do média způsobilo u *S. coelicolor* A3(2) (producenta aktinohordinu), *S. antibioticus* (producenta aktinomycinu) a *S. griseus* (producenta streptomycinu) výraznou nadprodukci antibiotik (Kawai *et al.* 2007). Jinou možností může být genová manipulace přímo v daném genovém shluku, jeho regulační oblasti anebo v jeho okolí na základě možného pleiotropního efektu na danou biosyntetickou dráhu (Baral *et al.* 2018). Ideální je v takovém případě provést metabolickou srovnávací studii mezi divokým typem a mutantním kmenem v daném BGC a tím daný produkt kryptického BGC identifikovat. Může se jednat se o inaktivaci (knock-out) genu, o němž se předpokládá jeho esenciální role v dané biosyntetické dráze. Provedením extrakce sekundárních metabolitů divokého typu a mutantního kmene, a jejich následnou analýzou na LC-MS, můžeme produkt kryptického BGC charakterizovat (Challis 2008). Opačným přístupem může být utlumení ostatních biosyntetických drah a posílení dráhy, jež produkuje prekursor pro požadovaný metabolit na základě identifikace genů v detailním metabolickém modelu producenta *in silico*.

Samotná predikce existence takového kryptického BGC je v dnešní době možná již díky rychle se rozšiřující databáze sekvencí DNA streptomycet za pomoci softwaru pro vyhledávání BGC (Baral *et al.* 2018).

c) Přenesení genového shluku do heterologního producenta

Produkce v heterologním producentu může být výhodná například pro zjištění, zda se podařilo naklonovat celý genový shluk důležitý pro produkci

požadovaného metabolitu. Dále je vhodná pro získání metabolitu z producentů, které je složité kultivovat v laboratorních podmínkách, nebo pro získání úplně nových metabolitů kombinací genů z různých biosyntetických drah anebo jejich mutací (Gomez-Escribano a Bibb 2013). V neposlední řadě je rovněž produkce v heterologním producentu ideálním způsobem, jak aktivovat BGC. Heterologního producenta obvykle volíme na základě jeho schopnosti vyšší produkce požadovaných sekundárních metabolitů, rychlého růstu a dobře charakterizované genetiky a metabolismu. V případě streptomycet jsou ideálními heterologními producenty *S. lividans* K4-114, série kmenů odvozených od *S. coelicolor* a *S. albus* J1074, které jsou geneticky upraveny k maximalizaci sekundárního metabolismu a zároveň je syntéza jejich vlastních nejdůležitějších sekundárních metabolitů poškozena. Genom *S. albus* J1074 je velký 6 841 649 bp a obsahuje 5 832 genů, což ho dělá nejmenším genomem napříč streptomycetami (Zaburannyi *et al.* 2014). Dalším vhodným heterologním producentem je *S. coelicolor* (Gomez-Escribano a Bibb 2013). Mezi nejvyužívanější laboratorní kmeny *S. coelicolor* patří například *S. coelicolor* CH999, jenž byl sestrojen za účelem produkce polyketidů tak, že genový shluk pro produkci aktinohordinu byl deletován a do genového shluku pro produkci prodigininů byla vnesena mutace (McDaniel *et al.* 1993). Další laboratorní kmeny jsou *S. coelicolor* M512, *S. coelicolor* M1146, *S. coelicolor* M1152 a M1154. Klonováním a modifikováním celého biosyntetického klastru tak, aby obsahoval místně-specifická integrační místa (site-specific integration sites), může být přenesen do heterologního producenta (Ochi 2016).

d) Genetický screening vycházející ze znalosti specifických enzymů

Jedná se o variantu genetického screeningu, kdy vycházíme ze znalosti specifických enzymů, které danou látku syntetizují, ale nejsou závislé na aktivitě BGC v laboratorních podmínkách. Tímto způsobem, za využití metod PCR, se postupovalo i v případě hledání producentů sekundárních metabolitů obsahujících homolog genu *hemA*, jehož produktem je enzym cyklizující aminolevulinát syntáza zapojená při biosyntéze C₅N jednotky.

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

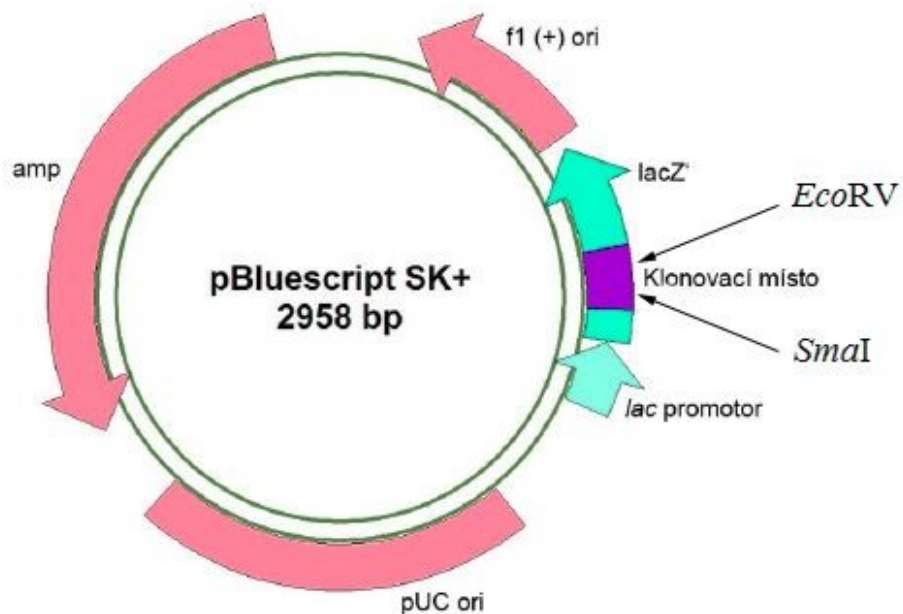
4.1.1 Bakteriální kmeny

- *Streptomyces monomycini* BCCO10 1552
 - Zdroj: půda, botanická zahrada Tbilisi, Gruzie
- *Streptomyces capoamus* BCCO10 1636
 - Zdroj: půda, deštný prales, Mount Cameroon, Kamerun
- *Escherichia coli* SURE[®]
 - jedná se o kmen používaný při procesu klonování DNA ve formě plasmidových vektorů
 - obsahuje gen *lacZ* pro β -galaktosidasu, jenž umožňuje tzv. „modro-bílou selekci“
 - je mutantní v genech pro rekombinaci DNA (tzn., neobsahuje geny způsobující štěpení nebo rekombinaci DNA)
 - nese geny pro rezistenci vůči tetracyklinu a kanamycinu
 - genotyp: *endA1, glnV44, thi-1, gyrA96, relA1, lac, recB, recJ, sbcC, umuC::Tn5uvrC, e14-Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 F'[proAB+ lacIq lacZΔM15 Tn10]*
 - kmen byl pro tuto práci použit s dovolením Mgr. Kateřiny Petříčkové, Ph.D. (Bakteriologická laboratoř, Ústav imunologie a mikrobiologie při 1. LF UK)
- *Escherichia coli* ET12567/pUZ8002
 - jedná se o kmen používaný při procesu mezidruhovému konjugaci
 - kmen neobsahuje methylasy, tzn., nedochází k methylovaní DNA, čímž umožňuje přenos DNA do streptomycet, jenž obsahují restriční systém pro methylovanou DNA
 - v chromozomu nese geny pro rezistenci vůči chloramfenikolu, tetracyklinu
 - v plasmidu pUZ8002 nese geny rezistence vůči kanamycinu

- plasmid pUZ8002 má také mutaci v *oriT* (sám se konjugací nepřenáší), ale umožňuje konjugaci jiných plasmidů s *oriT* z plasmidu RP4 pomocí *tra* genu
 - genotyp: *dam-13::Tn9*, *dcm-6*, *hsdM*, *hsdR*, *zjj-202::Tn10*, *recF143*, *galK2*, *galT22*, *ara-14*, *lacY1*, *xyl-5*, *leuB6*, *thi-1*, *tonA31*, *rpsL136*, *hisG4*, *tsx-78*, *mtl-1*, *glnV44*
 - kmen byl pro tuto práci poskytnut Dr. Bertoltem Gustem (Department of Molecular Microbiology, John Innes Centre, Norwich Research Park, Velká Británie)
- Senzitivní kmen *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* ATCC 6633 (Difco™, BD)
- kmen využívaný pro biologické testy
 - kmen byl pro tuto práci použit s dovolením Mgr. Kateřiny Petříčkové, Ph.D.

4.1.2 Vektory

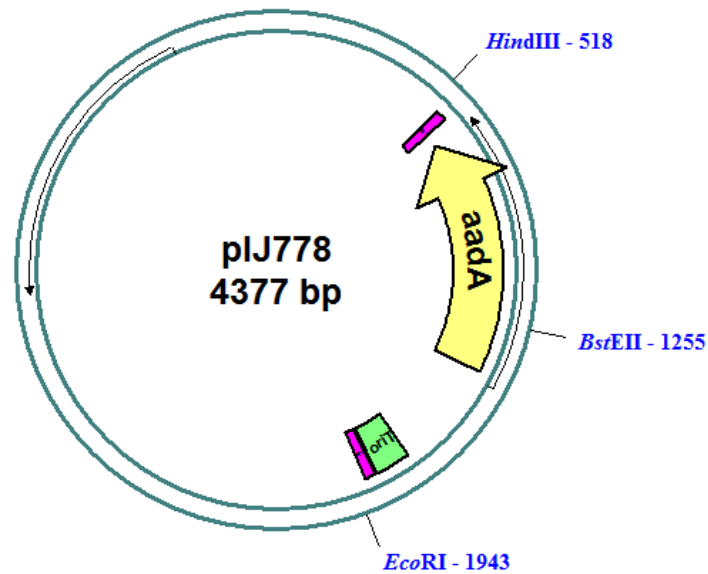
- pBluescript SK+
- klonovací vektor *E. coli*
 - obsahuje tzv. multiple cloning site (MCS), vícenásobné klonovací místo, které se nachází v *lacZ* genu
 - pokud je vektor přítomný v *E. coli*, umožňuje modro-bílou selekci na LB médiu obsahující X-gal a IPTG (isopropyl β -d-1-thiogalaktopyranosid)
 - obsahuje gen pro rezistenci k ampicilinu
 - vektor byl pro tuto práci použit s dovolením Mgr. Kateřiny Petříčkové, Ph.D. (Bakteriologická laboratoř, Ústav imunologie a mikrobiologie při 1. LF UK)
 - restriční mapa vektoru je zobrazena na obr. 14



Obr. 14 Restrikční mapa vektoru pBluescript SK+ sestavena v programu pDRAW32. *Amp* = oblast kódující rezistenci k ampicilinu. *LacZ'* = gen pro α -fragment β -galaktosidázy.

- pIJ778

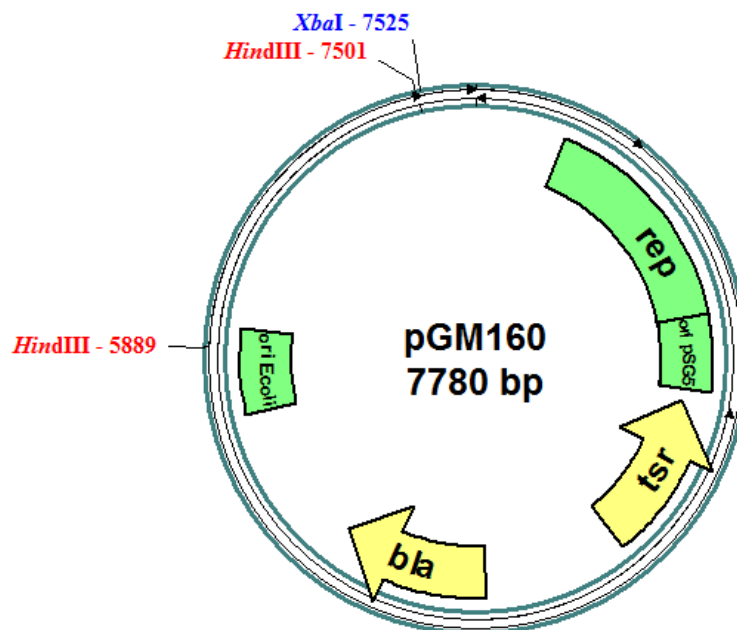
- jedná se o plasmid, jehož část (tzv. inzerční kazeta) byla použita pro disurpci *als* genu
- inzerční kazeta obsahuje gen *aadA* pro spektinomycinovou rezistenci a *oriT* místo pro konjugální přenos finálního plasmidového konstruktu do streptomycet
- restrikční mapa vektoru je zobrazena na obr. 15
- kmen byl pro tuto práci poskytnut Dr. Bertoltem Gustem (Department of Molecular Microbiology, John Innes Centre, Norwich Research Park, Velká Británie)



Obr. 15 Restrikční mapa vektoru pIJ778 sestavena v programu pDRAW32 se zaznačením použitých restrikčních míst. *aadA* = oblast kódující rezistenci k spektinomycinu. *OriT* = replikační počátek pro konjugální přenos finálního plasmidového konstruktu do streptomycet.

- pGM160

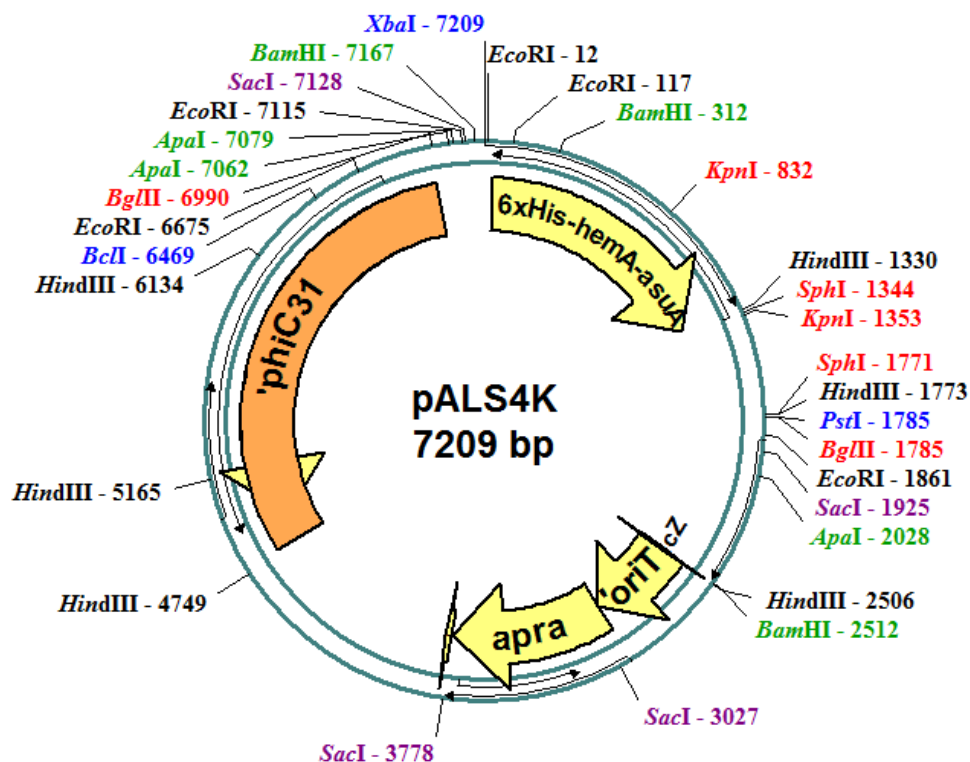
- jedná se o multikopiový „shuttle“ (bifunkční) vektor s replikací probíhající jak v *E. coli* tak ve streptomycetách (Muth *et al.* 1989)
- u streptomycet se jedná o termosenzitivní replikaci
- nese rezistenci na thiostrepton
- restrikční mapa vektoru je zobrazena na obr. 16
- vektor byl pro tuto práci použit s dovolením Mgr. Kateřiny Petříčkové, Ph.D. (Bakteriologická laboratoř, Ústav imunologie a mikrobiologie při 1. LF UK)



Obr. 16 Restrikční mapa vektoru pGM160 sestavena v programu pDRAW32 s vyznačením použitých restrikčních míst. *Bla* = betalaktamáza. *Tsr* = oblast kódující rezistenci vůči thioestreptonu. *pSG5* = replikační počátek plnící svou funkci ve streptomycetách. *Ori E. coli* = replikační počátek plnící svou funkci v *E. coli*. *Rep* = počátek replikace. Vektor není kompletně osekvenován.

- pALS4K

- odvozen od pMS17 (Rodriguez-Garcia *et al.* 2005)
- plasmid nesoucí *als* gen pod silným konstitutivním promotorem silným konstitutivním promotorem *ermE** z producenta asukamycinu *S. nodosus* ssp. *asukaensis*.
- obsahuje gen pro rezistenci k apramycinu a místo pro integraci do chromozomu z bakteriofága ΦC31
- obsahuje rovněž transferový replikační počátek (*oriT*) umožňující konjugativní přenos do streptomycet – jedná se o „shuttle vector“
- restrikční mapa vektoru je zobrazena na obr. 17



Obr. 17 Restrikční mapa plasmidu pALS4K sestavena v programu pDRAW32. *'phiC31* = oblast kódující integraci plasmidu do *attB* místa chromozomu streptomycet pomocí fágové integrázy (fág ΦC31). *'oriT* = počátek konjugálního transferu mezi Gram-pozitivními a Gram-negativními bakteriemi pocházející z konjugálního plasmidu pRP4. *Apra* = oblast kódující rezistenci k apramycinu. *6xHis-hemA-asuA* = konstitutivní promotor *ermE** pocházející z *S. nodosus* ssp. *asukaensis*.

4.1.3 Kultivační média

Není-li uvedeno jinak, tak:

- pro přípravu médií byla použita destilovaná voda (dH₂O)
- pro úpravu pH byly použity 1 M roztoky NaOH nebo HCl
- sterilizace probíhala v autoklávu při 121 °C, 101,5 kPa po dobu 25 min

Živný agar (Nutrient Agar)

- 28 g živný agar (Nutrient Agar, Oxoid)
- doplněno do celkového objemu 1 000 ml

LB (Lennox broth) médium

- 10 g tryptonu (Tryptone, Oxoid)
- 5 g kvasnicového extraktu (Yeast extract, Oxoid)

- 5 g NaCl
- pro tuhé médium přidáno navíc 20 g agaru (Agar Bacteriological No. 1, Oxoid)
- doplněno do celkového objemu 1 000 ml
- pH 7,2 – 7,4

YEME médium

- 3 g kvasnicového extraktu (Yeast Extract, Oxoid)
- 5 g peptonu (Neutralised Bacteriological Peptone, Oxoid)
- 3 g sladového extraktu (Malt Extract, Oxoid)
- 10 g glukózy (Lach-Ner)
- 340 g sacharózy (Lach-Ner)
- doplněno do celkového objemu 1 000 ml
- pH 7,2
- po sterilizaci přidán sterilní roztok 2,5 M MgCl₂ (2 ml na litr média)

GYM médium

- 4 g glukózy (Lach-Ner)
- 4 g kvasnicového extraktu (Yeast extract, Oxoid)
- 10 g sladového extraktu (Malt extract, Oxoid)
- 1 g NZ Amin A (NZ-Amine®, Type A, Wako)
- 2 g NaCl
- 3 ml OB solí
 - OB soli
 - 0,166 g CuSO₄ · 5H₂O
 - 0,25 g FeSO₄ · 7H₂O
 - 0,12 g MnSO₄ · 5H₂O
 - 0,5 g CaCl₂ · 2H₂O
 - 0,3 g ZnSO₄ · 7H₂O
 - doplněno do celkového objemu 100 ml
 - skladováno v nádobě z tmavého skla
- doplněno do celkového objemu 1 000 ml
- pH 7,3

SOC médium

- 4 g tryptonu (Tryptone, Oxoid)
- 1 g kvasnicového extraktu (Yeast Extract, Oxoid)
- 116 mg NaCl
- 38 mg KCl
- doplněno do celkového objemu 200 ml
- pH 6,9 – 7,1
- po sterilizaci přidány sterilní roztoky (na 200 ml):
 - 2 ml Mg^{2+} roztok (1M $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a 1M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
 - 2 ml 2M D-glukózy

2X YT médium

- 16 g tryptonu (Tryptone, Oxoid)
- 10 g kvasnicového extraktu (Yeast extract, Oxoid)
- 5 g NaCl
- doplněno do celkového objemu 1 000 ml
- pH 7,2

MS médium (Mannitol soya flour)

- 20 g manitolu (Lach-Ner)
- 20 g sójové mouky
- 20 g agaru (Agar Bacteriological No. 1, Oxoid)
- doplněno do celkového objemu 1 000 ml kohoutkovou vodou

4.1.4 Roztoky a pufry

TAE zásobní pufr (50x koncentrovaný)

- 2 M Tris (Sigma-Aldrich)
- 1 M kyselina octová (ApplyChem)
- 50mM EDTA (pH 8,0)
- doplněno dH_2O na požadovaný objem 500 ml
- pro elektroforézu používán 1x ředěný

Nanášecí pufr pro agarosovou elektroforézu (6x koncentrovaný)

- 0,25 % bromfenolová modř (w/v) (Sigma-Aldrich)

- 30 % glycerol (w/v) (Sigma-Aldrich)
- 5 x TAE pufr
- doplněno dH₂O na požadovaný objem

Skelné mléko (Glass milk)

- v 800 ml dH₂O rozsuspendujeme 400 g skelního prachu, promícháváme 60 min a necháme 90 min. stát
- centrifugujeme (10 min při 6 000 rpm) a vzniklý sediment rozmícháme v 200 až 300 ml dH₂O
- přidáme HNO₃ do 50% koncentrace a přivedeme téměř k varu a ochladíme
- centrifugujeme (10 min při 6 000 rpm) a sediment 4 až 6 krát promyjeme dH₂O
- pH 7
- zásobní 50% suspenzi dlouhodobě uchováváme v – 80 °C, jinak při 4 °C

Roztok NaI

- ve 250 ml dH₂O rozpustíme 450 g NaI
- pH roztoku upravíme pomocí 20 mM Tris (Sigma-Aldrich) na pH 7,5
- přidáme 1 g Na₂SO₃
- skladujeme při teplotě 4 °C v nádobě z tmavého skla

NEW WASH

- 100mM NaCl (Lachema)
- 1mM EDTA (Sigma-Aldrich)
- 50 % etanol (v/v)
- 10mM Tris (Sigma-Aldrich)
- pH 7,5

STET pufr

- 8 g sacharózy (Lach-Ner)
- 5 g Tritonu X-100 (Sigma-Aldrich)
- 10 ml 0,5M EDTA (pH 8,0) (Sigma-Aldrich)
- 5 ml 1M Tris-HCl (pH 8,0)

- doplněno do celkového objemu 100 ml dH₂O
- sterilizace probíhala v autoklávu při 121 °C, 101,5 kPa po dobu 25 min

Kyselý fenol-chloroform

- 5 g fenolu (Sigma-Aldrich)
- 5 ml chloroformu (Lachema)
- 1 ml dH₂O
- 5 mg 8-hydroxychinolinu (Sigma-Aldrich)
- skladujeme v nádobě z tmavého skla při teplotě 4 °C

Neutrální fenol-chloroform

- kyselý fenol-chloroform vytřepáváme s polovičním objemem 1M Tris-HCl (pH 8,8) po dobu 10 min
- po oddělení fází odstraníme horní vodnou fázi
- ke zbylé fázi přidáme poloviční objem 0,1M Tris-HCl (pH 8,0) po dobu 10 min
- po oddělení fází opět odstraníme horní fázi
- zbylou fázi přeneseme do tmavé láhve a uchováváme při 4 °C

TE pufr

- 10mM Tris-HCl (pH 8,0)
- 1mM EDTA (pH 8,0)
- sterilizace probíhala v autoklávu při 121 °C, 101,5 kPa po dobu 25 min

IPTG (isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosid)

- 0,2M zásobní roztok v dH₂O
- používaná výsledná koncentrace v médiu 0,2 mM
- uchováváme při – 20 °C

X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid)

- 4% zásobní roztok v dimethylformamidu
- používaná výsledná koncentrace v médiu 40 µg/ml
- uchováváme při – 20 °C

Pufry pro enzymy

10x T4 DNA ligační pufr (10x T4 DNA Ligase buffer, Thermo Scientific)

- 400mM Tris-HCl (pH 7,8 při 25 °C)
- 100mM MgCl₂
- 100mM DDT
- 5mM ATP

10x Klenow pufr (10x Klenow buffer, Thermo Scientific)

- 500mM Tris-HCl (pH 8,0 při 25 °C)
- 50mM MgCl₂
- 10mM DDT

10x FastAP pufr

- 100mM Tris-HCl (pH 8,0 při 37 °C)
- 50mM MgCl₂
- 1M KCl
- 0,2% Triton X-100
- 1 mg/ml BSA

10x B pufr (Thermo Scientific)

- 10mM Tris-HCl (pH 7,5 při 37 °C)
- 10mM MgCl₂
- 0,1 mg/ml BSA

10x G pufr (Thermo Scientific)

- 10mM Tris-HCl (pH 7,5 při 37 °C)
- 10mM MgCl₂
- 50mM NaCl
- 0,1 mg/ml BSA

10x O pufr (Thermo Scientific)

- 50mM Tris-HCl (pH 7,5 při 37 °C)
- 10mM MgCl₂
- 100mM NaCl
- 0,1 mg/ml BSA

10x R pufr (Thermo Scientific)

- 10mM Tris-HCl (pH 7,5 při 37 °C)
- 10mM MgCl₂
- 100mM KCl
- 0,1 mg/ml BSA

10x Tango pufr (Thermo Scientific)

- 33mM Tris-acetát
- 66mM octan draselný
- 10mM octan horečnatý
- 0,1 mg/ml BSA

10x EcoRI pufr (Thermo Scientific)

- 50mM Tris-HCl (pH 7,5 při 37 °C)
- 10mM MgCl₂
- 100mM NaCl
- 0,02% Triton X-100
- 0,1 mg/ml BSA

10x Eco136II, SacI pufr (Thermo Scientific)

- 10mM Bis-Tris Propan-HCl (pH 6,5 při 37 °C)
- 10mM MgCl₂
- 0,1 mg/ml BSA

10x KpnI pufr (Thermo Scientific)

- 10mM Tris-HCl (pH 7,5 při 37 °C)
- 10mM MgCl₂
- 0,02% Triton X-100
- 0,1 mg/ml BSA

Další používané roztoky:

- 0,5M EDTA (pH 8)
- octan sodný 3 M (pH 7)
- 20 % glycerol

- 2,5M a 10 mM MgCl₂
- lysozym 10 mg/ml (v dH₂O)
 - vše sterilizováno v autoklávu při 121 °C, 101,5 kPa po dobu 25 min

4.1.5 Enzymy

DNA ligáza

- T4 DNA ligase (5 U/μl, Thermo Scientific)

FastAP alkalická fosfatáza

- FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (1 U/μl, Thermo Scientific)

Klenowův fragment

- Klenow Fragment (10 U/μl, Thermo Scientific)

Restrikční endonukleázy (Thermo Scientific)

- *Bgl*II, *Bst*II, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III, *Kpn*I, *Msc*I, *Nae*I, *Not*I, *Pst*I, *Sac*I, *Sma*I, *Spe*I, *Xba*I, *Xho*I

RNáza A – roztok

- 1 mg/ml ve sterilní dH₂O
- převařit při teplotě 100 °C po dobu 10 min pro inaktivaci DNáz
- uchovávat v – 20 °C

T4 PNK

- T4 Polynucleotide Kinase (10 U/μl, New England Biolabs)

4.1.6 Antibiotika

Pokud není uvedeno jinak, tak:

- na přípravu roztoků antibiotik byla použita sterilní dH₂O
- roztoky antibiotik byly uchovávány při teplotě – 20 °C

Ampicilin (amp)

- koncentrace zásobního roztoku 100 mg/ml

- používaná výsledná koncentrace v médiu 100 µg/ml

Apramycin (apr)

- koncentrace zásobního roztoku 100 mg/ml
- používaná výsledná koncentrace v médiu 50 µg/ml

Chloramfenikol (cml)

- koncentrace zásobního roztoku 100 mg/ml ve 100% ethanolu
- používaná výsledná koncentrace v médiu 25 µg/ml

Kanamycin (kan)

- koncentrace zásobního roztoku 50 mg/ml
- používaná výsledná koncentrace v médiu 25 µg/ml

Kyselina nalidixová

- koncentrace zásobního roztoku 50 mg/ml
- používaná výsledná koncentrace v médiu 25 µg/ml

Thiostrepton (thio)

- koncentrace zásobního roztoku 30 mg/ml v DMSO
- používaná výsledná koncentrace v médiu 30 µg/ml

4.1.7 DNA oligonukleotidy

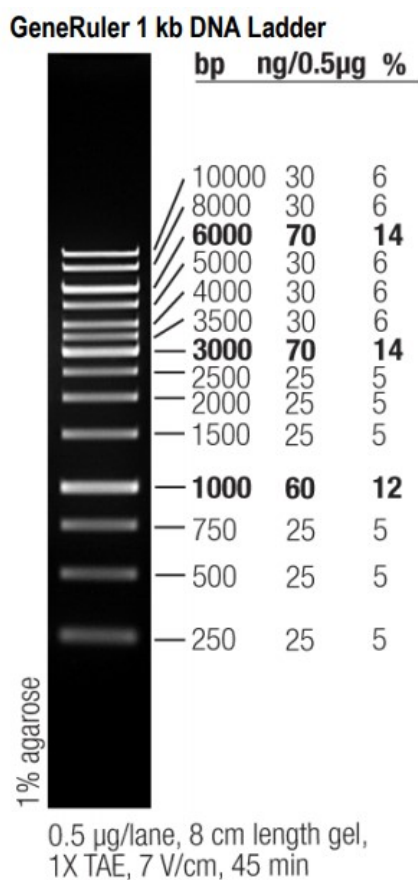
Název DNA oligonukleotidu	Sekvence DNA (5' – 3')
1552LR-F	TTC TGG TTG TAC GCC ACC AC
1552LR-R	CTG CAC CAG ACG CTG ATT TC
1552PR-F	CAT CTA CGT CCA GGC CAT CA
1552PR-R	GGT GAG CGA GAT CTC CAC CT
1636LR-F	GCA GAC CTC TTC GCC GTA GC
1636LR-R	TCT GGG AGG AAC TGG GCT TG
1636PR-F	CAC CGA GCT CTT CCA ACT CG
1636PR-R	AGA TGC TCT CCG TCC GCT AC

Spec200	ATT TTG CCA AAG GGT TCG TG
Spec1300	TCA CCA AGG TAG TCG GCA AA
1552wtL	GTA TCC GGC CAT CAC GTT GT
1552wtR	ATC CGC TCC GAA CTG TCC TC
1552wtonly	GCT GAC CCA TGC CGA GAT AG
1636wtL	CCT GCG CGG GTA CTT GTA GG
1636wtR	TTC GGA ATG GAG ACG ACG AT
1636wtonly	ACA TCG TCT CCG TCC TGG TC

Tab. 2 Název DNA oligonukleotidu v prvním sloupci, v druhém sekvence DNA. DNA oligonukleotidy byly dodány firmou Generi Biotech.

4.1.8 Velikostní standard

Thermo Scientific™ GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, Ready-to-Use 250 to 10 000 bp



Obr. 18 Velikostní standard používaný pro agarózovou gelovou elektroforézu. Převzato z: https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0013004_GeneRuler_1kb_DNALadder_250ug_UG.pdf

4.1.9 Komerční kity

Kit pro izolaci chromozomální DNA (Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega):

- Cell Lysis Solution
- Nuclei Lysis Solution
- Protein Precipitation Solution
- RNase Solution – 4 mg/ml
- Roztok RNasy A v DNA Rehydration Solution
- DNA Rehydration Solution – 10mM Tris-HCl (pH 7,4), 1mM EDTA (pH 8,0)

Kit pro izolaci plasmidové DNA z *E. coli* (High Pure Plasmid Isolation Kit, Roche):

- Suspension Buffer (50mM Tris-HCl, 10mM EDTA, pH 8,0; skladovaný v lednici při 4 °C)
- RNAsa A
- Lysis Buffer (0,2 M NaOH, 1% SDS)
- Binding Buffer (4M guanidin hydrochlorid, 0,5M octan draselný, pH 4,2)
- Wash Buffer I (etanol, 5M guanidin hydrochlorid, 20mM Tris-HCl, pH 6,6)
- Wash Buffer II (etanol, 20mM NaCl, 2mM Tris-HCl, pH 7,5)
- Elution Buffer (10mM Tris-HCl, pH 8,5)
- High Pure Filter Tubes
- Collection Tubes

KAPA 2G Robust PCR Kit:

- KAPA 2G Robust HotStart DNA Polymerase (5 U/μL)
- 5X KAPA 2G Buffer A with MgCl₂
- 5X KAPA 2G Buffer B with MgCl₂
- 5X KAPA2G GC Buffer with MgCl₂
- 5X KAPA Enhancer 1
- MgCl₂ (25mM)
- dNTP Mix (10mM každý dNTP)
- vše skladováno při - 20 °C

4.2 Metody

4.2.1 Metody izolace DNA

Izolace plasmidové DNA z *E. coli* (Sambrook a Russell 2011)

1. Kulturu buněk *E. coli* zaočkujeme do 1,5 ml LB média obsahující příslušná antibiotika a kultivujeme přes noc ve 2 ml plastových zkumavkách typu Eppendorf při 37 °C na třepačce (220 rpm).
2. Kulturu zcentrigujeme na stolní centrifuze (Mini Spin Plus, Eppendorf) v chladové místnosti (4 °C) při 12 000 rpm, 30 s.
3. Supernatant odlejeme a pelet rozsuspendujeme ve zbytku tekutiny.
4. Do zkumavky přidáme 300 µl STET pufru obsahující 200 µg lysozymu. Důkladně zvortexujeme (Vortex Genie®2, Scientific Industries).
5. Zkumavku inkubujeme na ledu po dobu 10 min.
6. Poté přeneseme zkumavky to termobločku (QBT1, Grant) a inkubujeme 2 min při 100 °C.
7. Zkumavku centrifugujeme (Mini Spin Plus, Eppendorf) v chladové místnosti (4 °C) při 12 000 rpm po dobu 25 min.
8. Do nové zkumavky odebereme ze supernatantu vrchní část (200 µl) a přidáme 200 µl vychlazeného (4 °C) isopropanolu.
9. Obsah zkumavky důkladně promícháme a srážíme po dobu 30 min při -20 °C.
10. Poté centrifugujeme (Mini Spin Plus, Eppendorf) v chladové místnosti (4 °C) při 12 000 rpm po dobu 10 min.
11. Supernatant odlejeme a přidáme 200 µl 75 % ethanolu. Centrifugujeme (Mini Spin Plus, Eppendorf) v chladové místnosti (4 °C) při 12 000 rpm po dobu 5 min. Supernatant odlejeme, opět přidáme 75 % ethanol a opět stejně centrifugujeme.
12. Pelet necháme vysušit na vzduchu a poté rozpustíme v 50 µl 1x TE pufru. Skladujeme při 4 °C.

Izolace plasmidové DNA z *E. coli* pomocí komerčního kitu (High Pure Plasmid Isolation Kit, Roche)

1. Kulturu buněk *E. coli* zaočkujeme do 2 ml LB média obsahující příslušná antibiotika a kultivujeme přes noc ve 2 ml plastových zkumavkách typu Eppendorf při 37 °C na třepačce (220 rpm).

2. Kulturu zcentrigujeme na stolní centrifuze (Mini Spin Plus, Eppendorf) v chladové místnosti (4 °C) při 14 500 rpm, 5 min.
3. Supernatant odlejeme a pelet rozsuspendujeme v 250 µl Suspension Buffer.
4. K směsi přidáme 250 µl Lysis Buffer, opatrně promícháme převrácením zkumavky.
5. Inkubujeme 5 min při pokojové teplotě.
6. K směsi přidáme 350 µl vychlazeného Binding Buffer a opět opatrně promícháme převrácením zkumavky.
7. Inkubujeme po dobu 5 min na ledu. Poté zcentrifugujeme na stolní centrifuze (Mini Spin Plus, Eppendorf) při 14 500 rpm, 10 min.
8. Do zkumavky (Collection Tube) umístíme filtrační kolonku (High Pure Filter Tube) a do ní pomocí pipety přeneseme supernatant. Směs zcentrigujeme na stolní centrifuze (Mini Spin Plus, Eppendorf) při 14 500 rpm, 1 min.
9. Ze zkumavky odstraníme prošlou tekutinu. Do kolonky napipetujeme 500 µl promývacího roztoku Wash Buffer I a zcentrigujeme na stolní centrifuze (Mini Spin Plus, Eppendorf) při 14 500 rpm, 1 min.
10. Ze zkumavky odstraníme prošlou tekutinu. Do kolonky napipetujeme 700 µl promývacího roztoku Wash Buffer II a zcentrigujeme na stolní centrifuze (Mini Spin Plus, Eppendorf) při 14 500 rpm, 1 min.
11. Sběrnou zkumavku s prošlou tekutinou odstraníme a nahradíme ji sterilní 1,5 ml plastovou zkumavkou typu Eppendorf, do které vložíme použitou kolonku.
12. Do kolonky přidáme 50 µl 1x TE pufru a zcentrifugujeme na stolní centrifuze (Mini Spin Plus, Eppendorf) při 14 500 rpm, 1 min.
13. Kolonku odstraníme a zkumavku obsahující plasmidovou DNA skladujeme při 4 °C.

Izolace genomové DNA streptomycet

Všechna množství jsou počítány na 1 g mycelia.

1. Mycelium kultivujeme v YEME médiu obsahujícím sacharózu do čtvrtého dne při 28 °C na třepačce při 250 rpm.
2. Mycelium zcentrifugujeme na centrifuze (Z 326 K, Hermle) 10 min při 8 000 rpm při pokojové teplotě.

3. Zcentrifugované mycelium zvážíme a rozsuspendujeme v 5 ml TE obsahujícím 34% sacharózu.
4. Dále k myceliu přidáme 10 mg lysozymu (Sigma-Aldrich) a promícháme. Směs inkubujeme ve vodní lázni (JB Nova, Grant) při 30 °C v plastové zkumavce typu Eppendorf.
5. Každých 15 min suspenzi 3x protáhneme pipetou.
6. Inkubace ve vodní lázni probíhá do doby, než dojde přidáním kapky 10% SDS ke kapce suspenze na mikroskopickém podložním sklíčku téměř k projasnění suspenze a jejímu zgelovatění.
7. Přidáme 1,2 ml EDTA (pH 8), opatrně promícháme a dále přidáme 0,13 ml roztoku pronasy. Znovu směs promícháme a inkubujeme 5 minut při 30 °C ve vodní lázni.
8. Poté přidáme 0,7 ml 10% SDS, promícháme a inkubujeme 1-2 h ve 37 °C ve vodní lázni.
9. Suspenzi přeneseme do odpařovací baňky a přidáme 6 ml fenolu, protřepáváme 10 min v pokojové teplotě.
10. Přidáme 6 ml chloroformu a protřepáváme 5 min.
11. Směs přeneseme do skleněných centrifugačních kyvet a centrifugujeme při 8 000 rpm, 10 min. Horní fázi odebereme pomocí skleněné Pasteurovy pipety a proces zopakujeme – znovu přidáme 6 ml fenolu, 10 minut protřepáváme v pokojové teplotě, následně přidáme 6 ml chloroformu, protřepáváme 5 min a centrifugujeme při 8 000 rpm, 10 min.
12. Horní fázi opět odebereme skleněnou Pasteurovou pipetou a pro odstranění fenolu přidáme 6 ml chloroformu a protřepáváme 5 min.
13. Opět směs zcentrifugujeme (8 000 rpm, 5 min) a horní fázi přeneseme do předem zvážené zkumavky a určíme hmotnost vzorku. Na každý gram vzorku přidáme 40 µg převařené RNázy A a směs inkubujeme 1 h při 37 °C.
14. Vzorek přemístíme do ledu a přidáme ¼ objemu 5M NaCl a vše promícháme.
15. Směs přeneseme do kádinky, přidáme poloviční objem 30% PEG 6000 (tak, aby výsledná koncentrace byla 10%) a směs mícháme zatavenou skleněnou Pasteurovou pipetou. Během srážení se DNA na zatavenou pipetu navine.
16. Takto navinutou DNA 2x opláchneme 1 ml vychlazeného 75% ethanolu a necháme sušit na vzduchu.

17. Po uschnutí DNA přeneseme i s pipetou do plastové zkumavky typu Eppendorf, kam přidáme navíc 500 μ l 1x TE pufru. DNA se takto nechá rozpouštět přes noc v lednici při 4 °C.
18. Další den po rozpuštění DNA v pufru přidáme 0,6 ml 3M octanu sodného a 1,2 ml 100% vychlazeného ethanolu.
19. Novou zatavenou Pasteurovou pipetou směs promícháme a opět na pipetu DNA navineme.
20. DNA znovu opláchneme 1 ml vychlazeného 75% ethanolu a necháme sušit na vzduchu.
21. Po uschnutí DNA přeneseme i s pipetou do plastové zkumavky typu Eppendorf, kam přidáme 200 μ l 1x TE pufru.
22. Takto DNA skladujeme při 4 °C.

Izolace chromozomální DNA ze streptomycet pomocí komerčního kitu (Wizard Genomic DNA Purification Kit, Promega)

1. Kulturu streptomycet kultivujeme na třepačce při 220 rpm v YEME médiu s příslušnými antibiotiky přes noc při 30 °C.
2. Do sterilní 2 ml plastové zkumavky typu Eppendorf přeneseme 2 ml kultury a zcentrifugujeme na stolní centrifuze centrifuze (Mini Spin Plus, Eppendorf) při 14 500 rpm, 5 min. Odlejeme supernatant.
3. K peletu přidáme 540 μ l EDTA a 60 μ l lysozymu, opatrně promícháme pomocí pipety.
4. Inkubujeme 10 min při teplotě 37 °C v termobločku (CH 100, Biosan).
5. Zcentrifugujeme na stolní centrifuze centrifuze (Mini Spin Plus, Eppendorf) při 14 500 rpm, 7 min. Odstraníme supernatant.
6. Do zkumavky přidáme 600 μ l Nuclei Lysis Solution a opatrně promícháme pomocí pipety.
7. Inkubujeme 5 min při teplotě 80 °C. Necháme vychladnout na pokojovou teplotu.
8. K směsi přidáme 3 μ l roztoku RNázy. Promícháme opatrným převrácením zkumavky.
9. Směs inkubujeme při 37 °C po dobu 45 min, poté necháme vychladnout na pokojovou teplotu.

10. Přidáme 200 µl Protein Precipitation solution a důkladně zvortexujeme. Inkubujeme na ledu po dobu 5 min.
11. Zcentrifugujeme na stolní centrifuze centrifuze (Mini Spin Plus, Eppendorf) při 14 500 rpm, 3 min.
12. Supernatant přeneseme do nové plastové 1,5 ml zkumavky typu Eppendorf, přidáme 600 µl isopropanolu. Promícháme převrácením zkumavky.
13. Zcentrifugujeme na stolní centrifuze centrifuze (Mini Spin Plus, Eppendorf) při 14 500 rpm, 3 min.
14. Supernatant odstraníme a pelet necháme vyschnout na vzduchu při pokojové teplotě.
15. Po vysušení přidáme k peletu 600 µl 70% ethanolu. Opět zcentrifugujeme.
16. Ethanol odstraníme a necháme pelet uschnout na vzduchu.
17. Po vyschnutí zkumavky přidáme 100 µl 1x TE pufru.
18. DNA rehydratujeme inkubováním po dobu 1 h při 65 °C anebo přes noc v lednici při 4 °C. Takto DNA také skladujeme.

Glass milk izolace DNA z agarosového gelu

1. Na 1% agarózový gel naneseme DNA Ladder (Gene ruler 1 kb, Thermo Scientific). Vedle něj naneseme PCR produkt s požadovanou DNA, ke kterému přidáme v 1/5 objemu 6x loading buffer.
2. Po skončení elektroforézy pomocí skalpelu odřízneme proužek obsahující DNA Ladder a část vzorku. Tento proužek gelu 15 min inkubujeme v barvicím roztoku (5 µl GelStar™ Nucleic Acid (Lonza) rozpoštěný v 50 ml 1x TAE).
3. Po osvětlení proužku gelu UV světlem určíme pozici fragmentu. Orientujeme se podle standardu a obarvené části vzorku, kde si zaznačíme polohu fragmentu a pruhy gelu zase následně přiložíme vedle sebe. Daný fragment následně z neobarveného gelu vyřízneme.
4. Gelový fragment zvážíme a na 0,1 g gelu přidáme 0,3 ml NaI roztoku.
5. Gel v plastové zkumavce typu Eppendorf inkubujeme v termobločku (QBT1, Grant) při 53 °C, dokud se agaróza nerozpustí (maximálně však 5 min). Během inkubace zkumavku párkrát jemně protřepeme.
6. Po skončení inkubace zkumavku přemístíme do ledu a do zkumavky přidáme 5 µl skelného mléka a zvortexujeme (Vortex Genie®2, Scientific Industries).

7. Zkumavku inkubujeme 10 min v ledu a poté 15 sekund centrifugujeme ve stolní centrifuze (Mini Spin Plus, Eppendorf).
8. Supernatant odlejeme a sediment 2-3x promyjeme 1 ml New Wash roztokem.
9. Po posledním promytí zkumavku ještě jednou krátce odstředíme a pomocí automatické pipety odstraníme zbytek roztoku New Wash. Pelet rozsuspendujeme ve 20 μ l sterilní dH₂O a DNA eluujeme při 53 °C po dobu 5 min.
10. Zkumavku na 1 min zcentrifugujeme a odebereme do čisté sterilní zkumavky supernatant s eluovanou DNA.

4.2.2 Metody další práce s DNA

Fenol-chloroformová extrakce DNA

1. K roztoku DNA v plastové zkumavce typu Eppendorf přidáme neutrální fenol-chloroform ve stejném objemu jako je roztok DNA.
2. Roztok s DNA a neutrálním fenol-chloroformem promícháme krátce na vortexu.
3. Plastovou mikrozukmavku typu Eppendorf stočíme na stolní centrifuze (Mini Spin Plus, Eppendorf) při 14 500 rpm po dobu 5 min.
4. Odebereme vodnou fázi obsahující DNA a přeneseme do čisté zkumavky typu Eppendorf.
5. DNA přesrážíme metodou srážení DNA octanu sodného a ethanolem.

Srážení DNA octanem sodným a ethanolem

1. K vodnému roztoku DNA přidáme 3M octan sodný (pH 7) o objemu 1/10 objemu roztoku DNA.
2. Dále přidáme 100% vychlazený ethanol (-20 °C) o 2-3 objemech roztoku DNA.
3. Srážíme podobu 40 min v teplotě -80 °C nebo přes noc v -20 °C.
4. Roztok stočíme na stolní centrifuze (Mini Spin Plus, Eppendorf) při 14 500 rpm po dobu 15 min při 4 °C v chladové místnosti.
5. Supernatant odstraníme a k peletu přidáme 2-3 objemy 75% vychlazeného ethanolu (-20 °C).
6. Opět stočíme na stolní centrifuze při 14 500 rpm po dobu 5 min při 4 °C v chladové místnosti.
7. Ethanol odstraníme a pelet necháme v plastové zkumavce vysušit na vzduchu.
8. Pelet DNA rozpustíme v 50 µl 1x TE pufru nebo v dH₂O.

Měření koncentrace DNA

1. Roztok DNA naředíme vodou stokrát do objemu 500 µl.
2. Na spektrofotometru (Ultrospec IIE spectrophotometer, LKB Biochrom) měříme absorbanci při vlnové délce 260 nm v křemenných kyvetách Q (Ultrospec Cells, Q, LKB Biochrom). Jako blank použijeme 100x naředěný roztok, ve kterém je daná DNA rozpuštěná (obvykle 1x TE).
3. Koncentraci DNA vypočítáme na základě výpočtu z rovnice:
Pokud $A_{260} = 1$, pak $c_{DNA} = 0,05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$

4. Čistotu DNA (kontaminaci proteiny) zjistíme měřením absorbance při vlnové délce 280 nm. Tu určíme na základě vztahu $\frac{A_{260}}{A_{280}}$. Podíl by se měl pohybovat mezi 1,8-2.

Štěpení DNA restrikčními endonukleázami

Štěpení DNA bylo prováděno restrikčními endonukleázami (Thermo Fisher Scientific) s pomocí příslušných pufrů. Roztok pro štěpení měl většinou celkový objem 10 μ l a skládal se z:

- 3 μ l roztoku DNA (0,1 – 3 μ g DNA)
- 1 μ l příslušného pufru
- 1 μ l restrikční endonukleázy
- 5 μ l dH₂O

Doba štěpení byla 1-1,5 hodiny při optimální teplotě pro daný enzym (obvykle 37 °C) v termobločku (CH 100, Biosan).

Pro štěpení dvěma restrikčními endonukleázami bylo od každé přidáno do směsi 0,5 μ l. Pufr byl zvolen takový, jenž se nejvíce blížil složení ideálních pufrů obou enzymů.

Ligace DNA (Sambrook a Russell 2011)

1. DNA po fenol-chloroformové extrakci a přesrážení ethanolem vysušíme pelet na vzduchu a k peletu přidáme:
 - 2 μ l 10x koncentrovaného T4 DNA ligačního pufru s ATP (Thermo Scientific)
 - 1 μ l T4 DNA ligázy (Thermo Scientific)
 - 2 μ l PEG 4000 pro ligaci tupých konců (Thermo Scientific)
 - 15 μ l dH₂O (pokud nepřidáváme PEG 4000, upravíme objem vody na 17 μ l)
2. Inkubujeme 1-2 hodiny, případně přes noc při 22 °C v termobločku (ThermoStat plus, Eppendorf).
3. Ligázu inaktivujeme inkubací 10 min při 65 °C nebo rovnou srážíme ethanolem.

Defosforylace 5'konců DNA po štěpení restrikčními endonukleázami

1. DNA štěpíme zvolenou restrikční endonukleázou v celkovém objemu 10 μ l.

2. Po ukončení štěpení přidáme do roztoku 1 μ l FastAP alkalické fosfatázy, 1 μ l pufru pro FastAP alkalickou fosfatázu a 8 μ l dH₂O
3. Inkubujeme 10 min při 37 °C
4. Po inkubaci inaktivujeme fosfatázu 5 min při 75 °C.

DNA agarózová elektroforéza v horizontálním uspořádání (Sambrook a Russell 2011)

- Agarózový gel: 1% agaróza (SeaKem® LE Agarose, Lonza) v 1x TAE pufru + 104x ředěný barvicí přípravek GelStar™ Nucleic Acid (Lonza).
- Elektroforetický pufr: 1x TAE (připravený ze zásobního 50× koncentrovaného TAE roztoku).
- Nanášecí pufr: 6× koncentrovaný nanášecí pufr pro agarózovou elektroforézu ve výsledné koncentraci 1×.
- Velikostní standard: GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, Ready-to-Use 250 to 1000 bp (Thermo Scientific).
- Napětí: 90 V.

Vzorky nanese do jamek a necháme putovat ke kraji gelu. Gel poté z elektroforetické vany vyjmeme a DNA zviditelníme nasvícením pod UV světlem na transiluminátoru (UVT-20 ME, Herolab) a vyfotíme.

PCR reakce

PCR reakční směs mícháme na ledu pomocí sterilních špiček. K PCR reakci používáme KAPA2G Robust PCR Kit a postupujeme dle přiloženého standardního protokolu. Teplota nasedání primerů se určí jako průměrná hodnota teplot tání T_m uvedených výrobcem (Generi biotech). PCR probíhá v celkovém objemu 25 μ l:

- 16,3 μ l sterilní dH₂O
- 5 μ l 5x KAPA2G GC pufr obsahující MgCl₂
- 2,5 μ l 2mM dNTPs
- 0,25 μ l Forward Primer
- 0,25 μ l Reverse Primer
- 0,5 μ l templátové DNA
- 0,2 μ l 5 U/ μ l KAPA2G Robust DNA polymerázy

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95 °C	3 min	1
Denaturace	95 °C	15 s	35
Nasedání primerů	Průměrná T _m	15 s	
Elongace	72 °C	90 s/kb	
Finální elongace	72 °C	5 min/kb	1

Tab. 3 Rozpis PCR.

Klonování PCR fragmentu natupo

Fragment

1. PCR fragment pro klonování byl nanesen na agarózovou gelovou elektroforézu (Consort EV243, Merck) a požadovaný fragment byl izolován z gelu pomocí Glass milk metody. Eluce DNA byla provedena do 25 µl sterilní dH₂O.
2. Pro fosforylaci 5' konců přidáme k eluované DNA 3 µl 10x PNK pufru, 1,5 µl 20 mM ATP a 1 µl PNK.
3. Inkubujeme v termobločku (ThermoStat plus, Eppendorf) při 37 °C po dobu 30 min.
4. PNK inaktivujeme v termobločku (QBT1, Grant) při 70 °C po dobu 10 min.
5. DNA extrahujeme neutrálním fenol-chloroformem, stočíme ve stolní centrifuze (Mini Spin Plus, Eppendorf) při 14 500 rpm po dobu 5 min. Odebranou horní fázi přesrážíme přidávkem 1/10 objemu 3M NaAc (pH 7) a 2-3 objemů 100% vychlazeného ethanolu (-20 °C). Srážíme 40 min v -80 °C.
6. Centrifugujeme ve stolní centrifuze (Mini Spin Plus, Eppendorf) při 14 500 rpm po dobu 15 min. Supernatant odlejeme a přidáme 2-3 objemy 75% ethanolu a centrifugujeme ve stolní centrifuze při 14 500 rpm po dobu 5 min.
7. Supernatant odlejeme a sediment vysušíme na vzduchu.
8. Suchý sediment rozpustíme v 17 µl sterilní dH₂O a přidáme 2 µl 10x Klenow pufru, 0,5 µl 2 mM dNTPs a 1 µl Klenow enzymu. Inkubujeme v termobločku (ThermoStat plus, Eppendorf) při 37 °C po dobu 15 min. Enzym inaktivujeme inkubací při 70 °C po dobu 10 min.

Vektor

1. 0,5 – 1 μg (1 μl) vektoru štěpíme v plastové zkumavce typu Eppendorf v celkovém objemu 10 μl příslušným enzymem, inkubujeme 1,5 – 2 hodiny při požadované teplotě v termobločku (ThermoStat plus, Eppendorf).
2. Pro defosforylaci 5' koncu přidáme po štěpení k objemu 8 μl sterilní dH_2O , 1 μl příslušného 10x pufru a 1 μl FastAP. Objem jsme takto upravili kvůli poměru enzymů, který by měl být maximálně 10 %. Inkubujeme v termobločku (ThermoStat plus, Eppendorf) při 37 °C po dobu 10 min.
3. FastAP inaktivujeme inkubací při 80 °C po dobu 15 min.

Fragment a vektor spojíme do jedné zkumavky

1. Do zkumavky přidáme stejný objem neutrálního fenol-chloroformu a extrahujeme. Odebereme vodnou fázi a přesrážíme ethanolem.
2. Vyschlý sediment rozpustíme v 15 μl sterilní dH_2O a přidáme 2 μl 10x legačního pufru s ATP, 1 μl T4 DNA ligasy a 2 μl PEG 4000). Inkubujeme v termobločku s chlazením (ThermoStat plus, Eppendorf) při 22 °C nejméně 2 hodiny, případně přes noc.
3. DNA přesrážíme pomocí ethanolu.
4. Provedeme elektroporaci buněk *E. coli* (viz dále).

Klonování DNA fragmentu s kohezivními konci

Fragment

1. Fragment DNA, štěpený restričními endonukleázami v celkovém objemu 50 μl , byl nanesen na agarózovou gelovou elektroforézu (Consort EV243, Merck) a poté izolován z gelu pomocí Glass milk metody. Eluce DNA byla provedena do 20 μl sterilní dH_2O .

Vektor

1. 10 μl vektoru štěpíme v plastové zkumavce typu Eppendorf v celkovém objemu 20 μl příslušným enzymem, inkubujeme 2 hodiny při požadované teplotě v termobločku (ThermoStat plus, Eppendorf).

2. Pro defosforylaci 5' koncu přidáme po štěpení 1 μ l FastAP. Inkubujeme v termobločku (ThermoStat plus, Eppendorf) při 37 °C po dobu 10-15 min.
3. FastAP inaktivujeme inkubací při 80 °C po dobu 15 min.
4. Štěpený vektor byl nanesen na agarózovou gelovou elektroforézu (Consort EV243, Merck) a poté izolován z gelu pomocí Glass milk metody. Eluce DNA byla provedena do 20 μ l sterilní dH₂O.

Fragment a vektor spojíme do jedné zkumavky

1. Do zkumavky přidáme stejný objem neutrálního fenol-chloroformu a extrahujeme. Odebereme vodnou fázi.
2. Vodnou fázi přesrážíme přidávkem 1/10 objemu 3M NaAc (pH 7) a 2-3 objemů 100% vychlazeného ethanolu (-20 °C). Srážíme 40 min v -80 °C.
3. Centrifugujeme ve stolní centrifuze (Mini Spin Plus, Eppendorf) při 14 500 rpm po dobu 15 min. Supernatant odlejeme a přidáme 2-3 objemy 75% ethanolu a centrifugujeme ve stolní centrifuze při 14 500 rpm po dobu 5 min.
4. Supernatant odlejeme a sediment vysušíme na vzduchu.
5. Vyschlý sediment rozpustíme v 17 μ l sterilní dH₂O a přidáme 2 μ l 10x legačního pufru s ATP a 1 μ l T4 DNA ligasy. Inkubujeme v termobločku s chlazením (ThermoStat plus, Eppendorf) při 22 °C nejméně 2 hodiny, případně přes noc.
6. DNA přesrážíme pomocí ethanolu.
7. Provedeme elektroporaci buněk *E. coli* (viz dále).

4.2.3 Metody transformace buněk plasmidovou DNA

Příprava elektrokompetentních buněk *E. coli* SURE a *E. coli* ET12567/pUZ8002 pro elektroporaci

1. Do 5 ml LB média s příslušnými antibiotiky zaočkujeme požadovanou kulturu *E. coli* a kultivujeme při 37 °C přes noc na třepačce (NB205L, N-Biotek) při 220 rpm.
2. 2 ml narostlé kultury zaočkujeme do 200 ml LB média v litrové baňce bez antibiotik. Třepeme na třepačce při 37 °C, 220 rpm.
3. Kultivaci ukončíme, až když kultura dosáhne OD₆₀₀ 0,7 – od této chvíle držíme kulturu neustále na ledu.
4. Kulturu stočíme v chlazené centrifuze (Z 326 K, Hermle) při 4 °C, 6 000 rpm po dobu 10 min.

5. Supernatant odlejeme a sediment rozpustíme ve 200 ml ledové sterilní dH₂O, totéž opakujeme ještě jednou.
6. Kulturu opět stočíme jako v bodě 4, supernatant odlijeme a buňky rozsuspendujeme v 0,5 ml ledového sterilního 10% glycerolu a rozdělíme po 50 µl do sterilních 1,5 ml plastových minizkumavek typu Eppendorf.
7. Buňky použijeme přímo k elektroporaci a nebo uchováváme v -80 °C.

Elektroporace elektrokompetentních buněk *E. coli* SURE a *E. coli* ET12567/pUZ8002 (Sambrook a Russell, 2001)

1. K vysušenému peletu DNA po srážení DNA octanem sodným a ethanolem přidáme 50 µl kompetentních buněk *E. coli* SURE nebo *E. coli* ET12567/pUZ8002, promícháme a inkubujeme na ledu 10 min.
2. Směs přemístíme do vychlazené elektroporační kyvety a v elektroporátoru provedeme transformaci dle parametrů přístroje (Electro Square Porator™ ECM 830, BTX®) pro *E. coli*:
 - napětí 2,0 kV
 - délka pulzu 99 µs
 - 10 pulzu
 - šířka mezery v kyvetě 1 mm
 - intenzita pole 20 kV/cm
3. Ihned přidáme 1 ml SOC média a kulturu kultivujeme 1-1,5 h v inkubátoru (NB205L, N-Biotek) při teplotě 37 °C za stálého třepání (120 rpm).
4. Buňky vysejeme na misku s LB agarem s příslušnými antibiotiky.
5. Misku s kulturou inkubujeme přes noc při 37 °C v inkubátoru (Q-Cell, Poll Lab)

Konjugační přenos plasmidu z *E. coli* ET12567/pUZ8002 do streptomycet

***E. coli* ET12567/pUZ8002**

1. Buňky *E. coli* ET12567/pUZ8002 vyrostlé na LB médiu s příslušnými antibiotiky přeočkujeme do 2 ml tekutého LB média obsahujícího opět příslušná antibiotika.
2. Buňky *E. coli* ET12567/pUZ8002 kultivujeme na třepačce (NB205L, N-Biotek) při 37 °C, 220 rpm přes noc.

3. Další den přeočkujeme 150 µl kultury do 15 ml tekutého LB média s příslušnými antibiotiky a kultivujeme při 37 °C, 220 rpm do OD₆₀₀ 0,4.
4. Po dosažení požadované optické denzity kulturu centrifugujeme (Mini Spin Plus, Eppendorf) při 4 °C, 5 000 rpm po dobu 5 min.
5. Supernatant odlejeme a pelet rozsuspendujeme v 10 ml LB média, následně opět centrifugujeme při 4 °C, 5 000 rpm po dobu 5 min.
6. Poté proces zopakujeme.
7. Po vyjmutí z centrifugy supernatant odlejeme a pelet rozsuspendujeme v 1 ml LB média v malé plastové zkumavce typu Eppendorf.

Streptomyces

1. Spory požadovaného kmene streptomycet vyrostlé na MS médiu v Petriho misce sterilně ošetříme 3 ml 2x YT médiem a setřeme do malé sterilní plastové zkumavky typu Eppendorf.
2. Spory ve zkumavce podrobíme teplotnímu šoku při 50 °C (ThermoStat plus, Eppendorf) po dobu 10 min.
3. Poté k sporám přidáme 0,5 ml kultury buněk *E. coli* ET12567/pUZ8002 a ty centrifugujeme při 14 500 rpm po dobu 1 min.
4. Část supernatantu odstraníme, ve zbylé části pelet rozsuspendujeme a napipetujeme jej na Petriho misku obsahující MS médium.
5. Kulturu kultivujeme přes noc v termostatu při 30 °C do druhého dne.
6. Další den rozpustíme v 1 ml sterilní H₂O požadovanou koncentraci kyseliny nalidixové a příslušného antibiotika, na nějž nese rezistenci přenášený plasmid, a tímto roztokem přelejeme povrch misky pro usmrcení ET buněk. Na kyselinu nalidixovou jsou streptomyces přirozeně rezistentní.
7. Misky kultivujeme v termostatu, dokud se neobjeví první kolonie.

4.2.4 Analytické a separační metody

Extrakce sekundárních metabolitů ze streptomycet

Inokulum

1. Do 30 ml GYM média zaočkujeme spory požadovaného kmene streptomycet a kultivujeme 48 h při 30 °C na třepačce při 220 rpm.

Fermentace

1. Z inokula odebereme 8 ml a ty zaočkujeme do 80 ml GYM média a kultivujeme 72 h. Kulturu stočíme při pokojové teplotě 10 min při 5 000 rpm. Supernatant slejeme do odpařovací baňky a dále pracujeme s buňkami a supernatantem (médiiem) zvlášť.

Supernatant

1. V supernatantu rozpustíme NaCl tak, aby vznikl nasycený roztok (29,2 g NaCl na 100 ml supernatantu – cca 5M roztok).
2. K roztoku přidáme 1/3 objemu ethylacetátu a v odpařovací baňce necháme 30 minut třepat na reciproční třepačce při 250 rpm v chladové místnosti (4 °C), ve tmě.
3. Směs stočíme při pokojové teplotě 15 minut při 5 000 rpm.
4. Horní ethylacetátovou fází přeneseme skleněnou pipetou do odpařovací baňky, kterou uložíme do -20 °C, dokud nedokončíme práci s buňkami.

Buňky

1. K buňkám přidáme aceton o objemu ¼ celkového objemu kultury (20 ml).
2. Suspenzi třepeme na reciproční třepačce v dělicí nálevce 30 minut při 250 rpm v chladové místnosti, ve tmě.
3. Směs poté přefiltrujeme přes filtrační papír do odpařovací baňky a dále odpařujeme na rotační vakuové odparce (LABOROTA 4003 – control, Heidolph Instruments) při teplotě vodní lázně 37 °C, podtlak se pohybuje mezi 160-150 mbar.
4. Poté, co v baňce zbyde pouze malé množství vodné fáze, odpařování ukončíme a ke zbytku kapaliny přidáme 2-3 objemy (6-8 ml) ethylacetátu a třepeme v odpařovací baňce na reciproční třepačce 30 min při 250 rpm v chladové místnosti ve tmě.
5. Poté směs stočíme při pokojové teplotě 15 min při 5 000 rpm.
6. Horní ethylacetátovou fází přidáme do odpařovací baňky obsahující ethylacetátovou fází z extrakce ze supernatantu.
7. Ethylacetátovou fází odpařujeme do sucha na rotační vakuové odparce při teplotě vodní lázně 37 °C a podtlaku 150-160 mbar.

8. Poté do odpařovací baňky nalejeme přibližně 1 ml chloroformu, stěny důkladně opláchneme skleněnou pipetou a extrakt následně přeneseme do vialky z tmavého skla, kdy je extrakt zakonzentrován na 100 μ l. Skladujeme při -20 °C.

Chromatografie na tenké vrstvě (TLC)

Mobilní fáze byla tvořena benzenem a acetonem v poměru 3:2 (v/v). Stacionární fázi tvořily TLC hliníkové desky (TLC Silica gel 60 F254, Merck) pokryté vrstvou silikagelu s fluorescenčním indikátorem F₂₅₄.

1. Vzorky nanese na TLC desku tak, aby byly od kraje vzdáleny 1 cm a mezi sebou tvořily rozestupy o vzdálenosti 1,5 cm. Startovací linii nanese 2 cm od spodního okraje.
2. Vzorky nanese na startovací linii pomocí skleněné mikrostříkačky Hamilton.
3. Po zaschnutí skvrn TLC desku vložíme do skleněné nádoby obsahující mobilní fázi do výšky 1 cm. Vyvíjení ukončíme, když skvrna mobilní fáze dosáhne cca 1 cm od horního konce TLC desky.
4. Po uschnutí desku vyfotografujeme při ozáření UV světlem anebo použijeme pro biologický test (viz dále).

Biologický test

Pro biologický test byl použit senzitivní kmen *Bacillus subtilis*. Ten byl kultivujeme ve 30 ml komerčního TSB média (Oxoid) přes noc při 37 °C.

1. Do čtvercové misky nalejeme živný agar tak, aby v tenké vrstvě médium zalilo dno. Misku s médiem necháme ztuhnout.
2. Do dalších 25 ml rozvařeného (tekutého, ale mírně vychladlého) média přidáme 1 ml tekuté kultury obsahující spory *Bacillus subtilis*. Tímto opět přelejeme misku a opět necháme zatuhnout.
3. Na misku se zatuhlým médiem poté přiložíme TLC desku obsahující vzorky extraktů tak, aby mezi deskou a agarem nebyly bubliny. Deska s miskou se takto ponechá 15 minut v laminárním boxu, poté z povrchu agaru odstraníme desku a misku kultivujeme při 30 °C přes noc.
4. Další den pozorujeme inhibiční zóny a vyfotografujeme.

Kapalinová chromatografie se spektrofotometrickou detekcí v UV/VIS oblasti a tandemovou hmotnostní detekcí (LC-UV/VIS-MS/MS)

Extrakty z kmenů BCCO10 1636 a BCCO10 1552 byly analyzovány pomocí LC-UV/VIS-MS/MS. Analýza a vyhodnocování byly provedeny panem Ing. Davidem Kahoun, Ph.D. při Jihočeské Univerzitě v Českých Budějovicích.

Kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography, LC) slouží k separaci jednotlivých složek extraktu na základě jejich rozdílné distribuce mezi stacionární fází umístěné v chromatografické koloně a mobilní fází, která touto chromatografickou kolonou protéká. Hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry, MS) se ve spojení s LC používá jako detekční technika, při níž jsou molekuly z eluátu z LC nejprve převedeny na ionty, které jsou následně rozděleny podle jejich poměru hmotnosti a náboje (m/z) a relativní intenzity všech jednotlivých iontů jsou zaznamenány ve formě hmotnostního spektra.

V každé analýze vzorku byly provedeny záznamy absorbance v celé UV i VIS oblasti, záznamy jednoduchých skenů (full scan MS) i záznamy skenů produktových iontů vzniklých cílenou fragmentací z předem definovaných vybraných prekurzorových iontů (data dependent full scan MS/MS), a to vše při podmínkách pozitivní i negativní ionizace vyhřívaným elektrosprejem. V průběhu celé analýzy tak byly průběžně získávány plná absorpční UV/VIS spektra a FSMS i ddFSMS/MS hmotnostní spektra dle definovaných podmínek.

Pro kvalitativní analýzu byl použit program Xcalibur Qual Browser (Thermo Scientific©). Program je vhodný pro analýzu neznámých sloučenin a pro potvrzení cílových sloučenin.

Příprava vzorku k analýze:

Vzorek byl pipetou přenesen do plastové mikrozkuhavky typu Eppendorf o objemu 1,5 ml, která byla centrifugována při 20 000 g po dobu 10 min při 7 °C. Poté byl supernatant přenesen do skleněného inzertu o objemu 400 μ l, který byl umístěn ve skleněné HPLC vialce o objemu 1,5 ml. Vialka byla uzavřena teflonovým septem a vzorek byl poté ihned analyzován.

Podmínky LC-UV/VIS-MS/MS analýzy:

Chromatografická separace byla provedena pomocí chromatografické kolony WATERS ACQUITY UPLC BEH C18 o rozměrech 50 x 2,1 mm s velikostí částic 1,7 μm (číslo produktu: 186002350) na chromatografickém systému Thermo Ultimate 3000. Jako mobilní fáze A byla použita voda s přidavkem kyseliny mravenčí (0,1 % obj.) a jako mobilní fáze B byl použit acetonitril s přidavkem kyseliny mravenčí (0,1 % obj.). Teplota zásobníku vzorků činila 7 °C, teplota kolonového prostoru činila 30 °C, průtok mobilní fáze byl 0,5 ml za minutu a tlak systému za výchozích podmínek gradientového programu (tab. 4) dosahoval 400 bar. Objem nástřiku vzorku byl 2 μl .

Retenční čas (min)	Mobilní fáze A [%]	Mobilní fáze B [%]
0	95	5
1	95	5
21	5	95
22	95	5
29	95	5

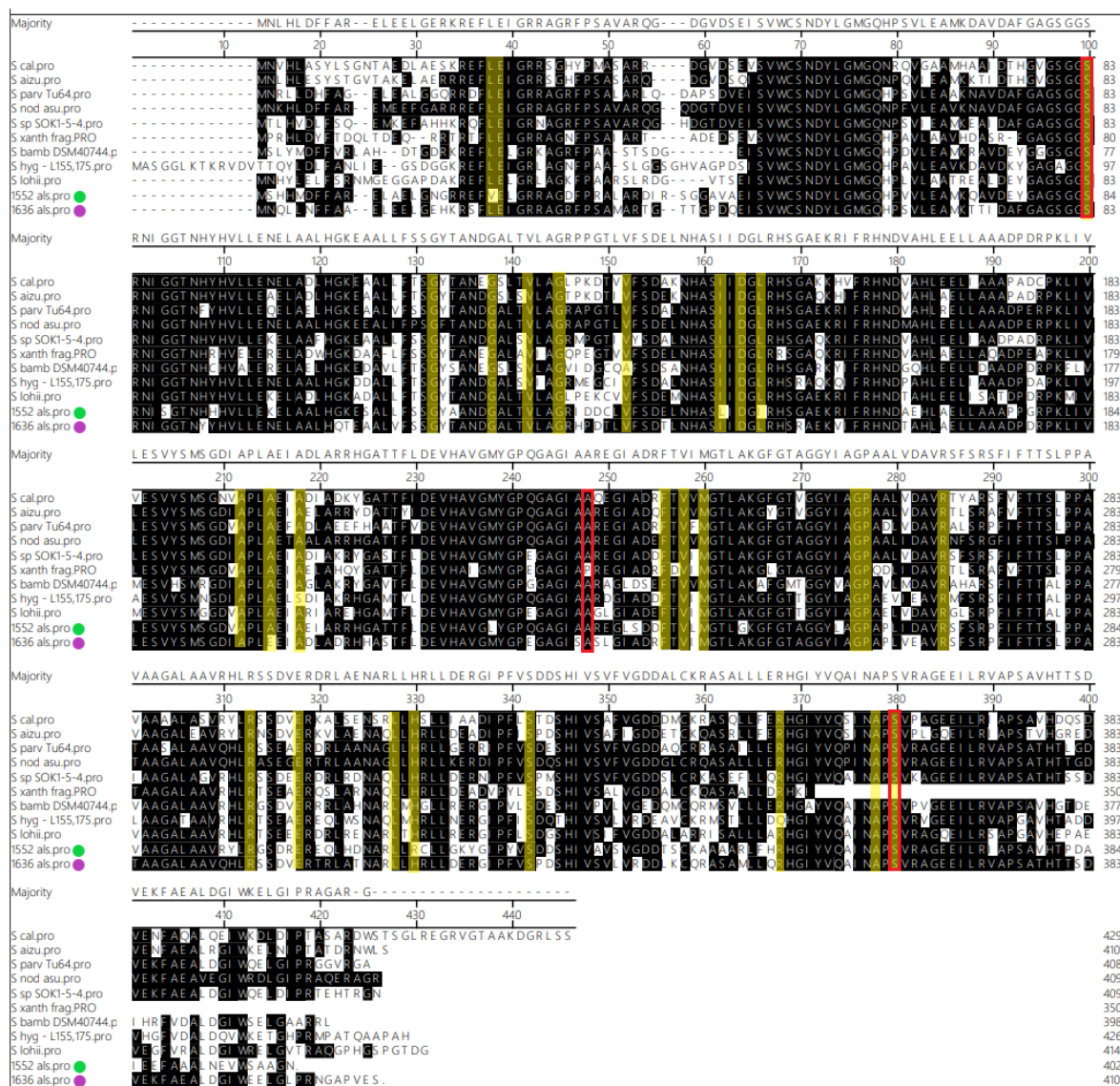
Tab. 4 Gradientový program.

Spektrofotometrická detekce byla provedena v režimu záznamu plných spekter v rozsahu 190-800 nm a zároveň v režimu záznamu 4 fixních vlnových délek: 200, 250, 300 a 500 nm. Hmotnostní detekce byla provedena za použití vyhřívaného elektrospreje Thermo HESI II a lineární iontové pasti Thermo Velos Pro při následujících podmínkách: napětí na kapiláře +/- 3 kV, teplota kapiláry 350 °C, průtok hlavního zmlžovacího plynu 60 arb., průtok pomocného zmlžovacího plynu 20 arb., potenciál na brzdící elektrodě před iontovou pastí +/- 9.0 V. Byly provedeny záznamy jednoduchých skenů (full scan MS) v rozsahu 200-1200 m/z i záznamy skenů produktových iontů (data dependent full scan MS/MS) z prekurzorů v rozsahu 200-1200 m/z.

5 Vypracování a výsledky

5.1 Srovnání aminokyselinových sekvencí homologů genů *als*

Oba kmeny BCCO10 1552 a BCCO10 1636 vyšly z genetického screeningu jako pozitivní na přítomnost genu *als* (*hemA*). Proto bylo vhodné provést srovnání aminokyselinových sekvencí produktů daných genů (obr. 19) pro ověření, zda obsahují všechna aminokyselinová residua konzervovaná pro unikátní enzym cyklizující 5-aminolevulinát syntázu a také zda obsahují i všechna residua důležitá pro její funkci. Tyto aminokyseliny byly definovány již Petříčkovou *et al.* 2015. Pro srovnání byli vybráni jednotliví producenti známých manumycinů obsahujících C₅N jednotku.

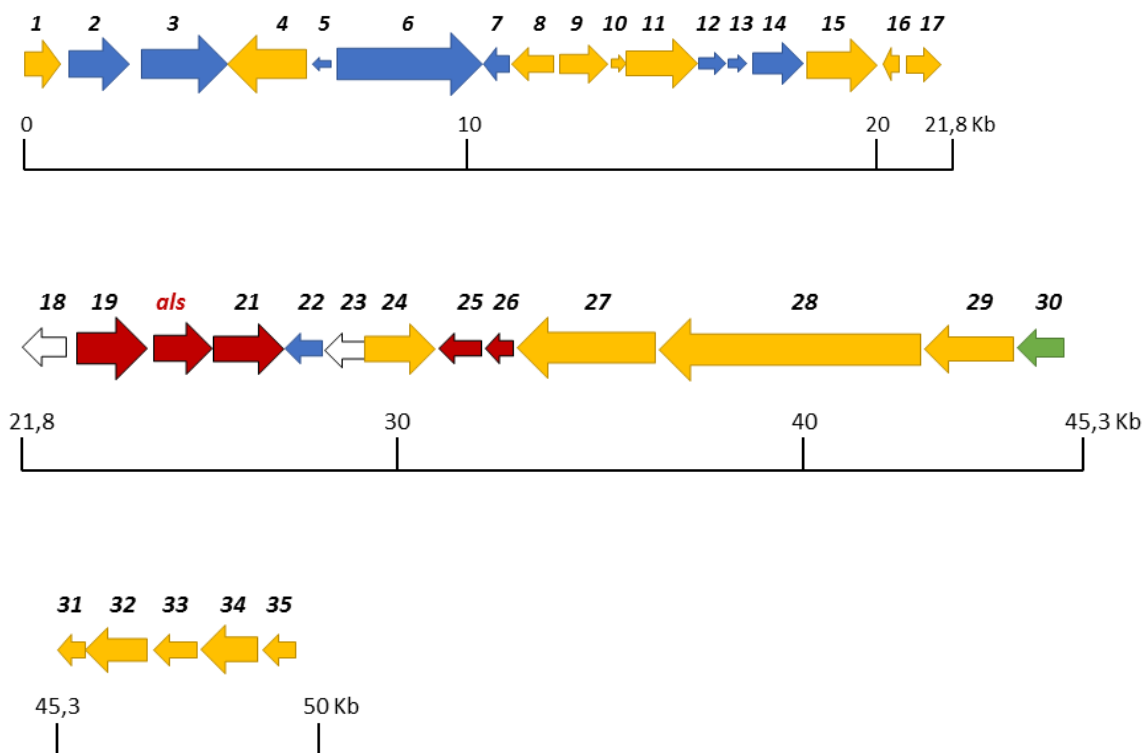


Popis obrázku na další straně

Obr. 19 Porovnání aminokyselinových sekvencí produktu genu *als* zástupců jednotlivých producentů a kmenů BCCO10 1552 a BCCO10 1636. *S. calvus* – producent annimycinu, *S. aizunensis* – producent Eco-02301, *S. parvulus* – producent manumycinu A, *S. nodosus* ssp. *asukaensis* – producent asukamycinu, *S. aureus* – producent colabomycinu E, *S. xanthochromogenus* – producent reduciomycinu, *S. bambergiensis* – producent moenomycinu A, *S. hygrosopicus* – producent L-155,175, *S. lohii* – producent bafilomycinu B1, kmen BCCO10 1552 (zelená značka), kmen BCCO10 1636 (fialová značka). Všechna aminokyselinová residua shodná s produktem *als* genu *S. nodosus* ssp. *asukaensis* jsou na černém podkladu. Aminokyselinová residua, která se liší od klasické ALAS a jsou striktně konzervována pro cALAS, jsou zvýrazněna žlutě. Residua přímo spojená s aktivitou cALAS jsou v červených rámečcích (Petříčková *et al.* 2015).

5.2 Genetická analýza kmene BCCO10 1636

Kmen BCCO10 1636 byl pro tuto práci vybrán na základě genetického screeningu na přítomnost homologu genu *hemA*. Genetickou analýzou 50 kbp dlouhého úseku DNA byla zjištěna přítomnost všech tří genů (*all*, *als*, *ams*) v operonu odpovědném za formaci C₅N jednotky (obr. 20). Byly objeveny i další geny homologní s geny biosyntetického genového shluku pro asukamycin (*Streptomyces nodosus* subsp. *asukaensis*), který se řadí mezi manumyciny.



Popis obrázku na další straně

Obr. 20 Lokus o velikosti 50 kbp s otevřenými čtecími rámci (ORF) v okolí genu *a/s* kmene BCCO10 1636. Popis jednotlivých čtecích rámců viz tabulka 5 níže. **Žlutá** = ORF kódující potenciální enzymy a produkty zapojené v sekundárním metabolismu, **červená** = ORF homologní ke genům kódujícím biosyntézu manumycinů, **bílá** = neurčeno, **zelená** = transpozázy, **modrá** = ostatní ORF.

ORF	Podobnost ke genům pro:	Funkce	Nejbližší protein
1	ABC transportní systém (ATPázová/permázová podjednotka)	Přenášení látek přes membránu za spotřeby ATP.	RPE38095.1
2	Chitináza	Rozpojování glykosidických vazeb v chitinu.	WP_123971906.1
3	Koagulační faktor	Vazba sacharidů.	WP_123971905.1
4	MFS (major facilitator superfamily) transportér	Membránový transport pomocí na základě osmotického tlaku.	WP_089106019.1
5	MarR transkripční regulátor	Regulace operonu, jenž kóduje rezistenci vůči různým druhům antibiotik, například tvorbou efluxních pump.	RPE38091.1
6	AAA ATPáza	Hydrolýza ATP s využitím energie pro konformační změny.	WP_143675131.1
7	TetR/AcrR transkripční regulátor	Vazba na DNA, monitorování okolí buňky – osmotický stres, eflux, produkce antibiotik atd.	WP_089104339.1
8	LLM F420-dependentní oxidoreduktáza	Oxidačně redukční reakce.	WP_136722945.1
9	Cytochrom P450	Oxidačně redukční reakce.	WP_129251097.1
10	Ferredoxin	Katalyzátor oxidoredukčních procesů.	WP_030077822.1
11	MFS (major facilitator superfamily) transportér	Membránový transport malých molekul na základě osmotického tlaku.	WP_093713798.1
12	TetR transkripční regulátor	Jednokomponentové regulátory spojené s antibiotickou rezistencí.	WP_165234659.1
13	MarR transkripční regulátor	Regulace operonu, jenž kóduje rezistenci vůči různým druhům	WP_120682186.1

		antibiotik, například tvorbou efluxních pump.	
14	Transaldoláza	Propojení glykolytické a pentózo-fosfátové dráhy.	WP_055587560.1
15	FAD-dependentní oxidoreduktáza	Přenos elektronu z jedné molekuly na druhou.	WP_030921499.1
16	TetR/AcrR transcripční regulátor	Vazba na DNA, monitorování okolí buňky – osmotický stres, eflux, produkce antibiotik atd.	WP_035865210.1
17	SDR NAD(P)-dependentní oxidoreduktáza	Oxidačně redukční reakce.	WP_030921519.1
18	Hypotetický protein		WP_165941468.1
19	Ligáza mastných kyselin s dlouhým řetězcem (long-chain fatty acid--CoA ligase) / amid syntáza (AMS)	Homolog <i>asuD1</i> kódujícího amid syntázu, která připojuje C ₅ N jednotky k dolnímu polyketidovému řetězci manumycinů amidovou vazbou. 56.05% podobnost na základě srovnání nukleotidové sekvence.	WP_093508255.1
als	5-aminolevulinát syntáza (ALS)	Homolog <i>asuD2</i> . 81.53% podobnost na základě srovnání nukleotidové sekvence.	WP_093502023.1
21	5-aminolevulinát CoA-ligáza (ALL)	Homolog <i>asuD3</i> . 68.97% podobnost na základě srovnání nukleotidové sekvence.	BBA21084.1
22	Transkripční regulátor	48% podobnost s <i>asuR1</i> na základě srovnání nukleotidové sekvence.	SEF00489.1
23	Hypotetický protein		WP_078901157.1
24	NAD(P)/FAD-dependentní oxidoreduktáza	Přenos elektronu z jedné molekuly na druhou.	WP_120682158.1
25	Ketoacyl-ACP syntáza III	Homolog <i>asuC4</i> . 62% podobnost na základě srovnání nukleotidové sekvence. Kóduje katalytickou podjednotku PKS typu 2 pro syntézu horního polyketidového řetězce.	WP_037909573.1

26	Thioesteráza	Homolog <i>asuC15</i> . 48% podobnost na základě srovnání nukleotidové sekvence.	WP_157856180.1
27	Polyketid syntáza typu I	Startovací PKS, která zřejmě ztratila zbylé PKSI geny, možná i některé moduly. Obsahuje ketoacyl syntázovou doménu, acyltransferázovou doménu a vazebnou doménu pro pyridoxalfosfátový kofaktor (PP). Neobsahuje acyl-carrier protein.	WP_051950824.1
28	SDR NAD(P)-dependentní oxidoreduktáza	Oxidačně redukční reakce.	WP_120682162.1
29	Acyl-AMP ligáza	Aktivace mastných kyselin a přenos na PKS.	WP_078901158.1
30	Transpozáza	Katalyzuje přenos transpozonu (nebo obecně jakékoli DNA ohraničené rozpoznávanými úseky DNA) do jiné části genomu.	WP_078901159.1
31	SDR NAD(P)-dependentní oxidoreduktáza	Oxidačně redukční reakce.	WP_051950829.1
32	NAD(P)-vázající protein	Oxidačně redukční reakce.	WP_051950830.1
33	Enoyl-CoA hydratáza/isomeráza	Katalyzuje konverzi cis- nebo trans- dvojité vazby koenzymu A.	WP_157856181.1
34	NAD(P)-vázající protein	Oxidačně redukční reakce.	WP_051950831.1
35	SDR NAD(P)-dependentní oxidoreduktáza	Oxidačně redukční reakce.	WP_051950832.1

Tab. 5 Odhadované funkce otevřených čtecích rámců 50 kbp dlouhého lokusu kmene BCCO10 1636.

Otevřené čtecí rámce 27 - 33 jsou homologní s geny *Streptomyces yeochonensis*, které tvoří hypotetický biosyntetický klastr, jehož funkce je neznámá a podobnost s ostatními známými klastry nízká (antiSMASH analýza; Blin *et al.* 2019).

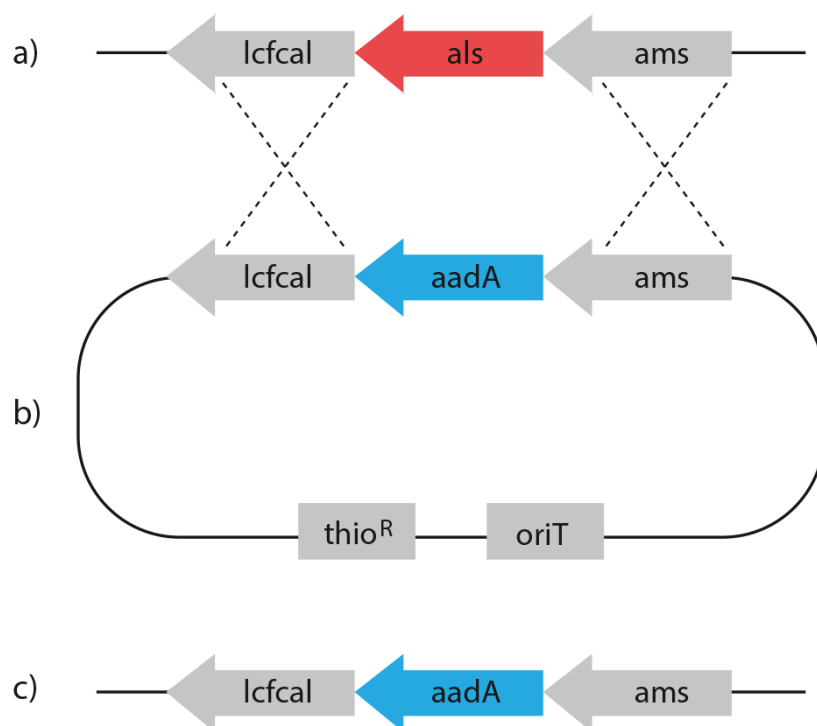
5.3 Disrupce genu *als* u kmene BCCO10 1636

I přesto, že máme k dispozici genetickou informaci, nelze na základě pravděpodobné funkce kódovaných proteinů příliš dobře predikovat strukturu syntetizovaného sekundárního metabolitu. Geny se vůbec nemusejí biosyntézy dané látky

účastnit, mohou být pouhým produktem přestaveb chromozomu a horizontálního genového přenosu, který není aktivní. Vhodným způsobem, jak toto ověřit, je disrupce. Disrupcí genu dosáhneme jeho inaktivace, a tím i zamezení funkčnosti výsledného proteinu. Disrupci genu lze provést jeho výměnou za kazetu kódující rezistenci k antibiotiku, a to metodami molekulárního klonování.

Kmen BCCO10 1636 obsahuje 3 geny pro syntézu a připojení C₅N jednotky k dolnímu řetězci manumycinů, a to geny pro: ligázu mastných kyselin s dlouhým řetězcem, *LCFCAL* (long-chain fatty acid CoA ligase = *all*, ORF21), 5-aminolevulinát syntázu, *als* (*hemA*), a amidsyntázu *ams* (ORF19). Gen *als* byl cílem disrupce – kóduje cyklizující aminolevulinát synthasu, enzym, který kondenzuje glycin a sukcinyl-CoA za vzniku kyseliny aminolevulové, kterou navíc také cyklizuje. Je tedy pro vznik C₅N jednotky klíčový a je konzervovaný napříč všemi producenty metabolitů s C₅N jednotkou.

Disrupce genu byla provedena pomocí rezistenční kazety obsahující gen *aadA* pro rezistenci ke spektinomycinu a *oriT* místo pro konjugační přenos finálního plasmidového konstrukt do kmene BCCO10 1636. Inzerční kazeta byla spojena na levé straně (levé rameno – LR) s 1 491 bp dlouhým úsekem tvořeným genem *all* (*lcfc*) a zbytkem genu *als* a na pravé straně (pravé rameno – PR) s 1 495 bp dlouhým úsekem tvořeným genem *ams* a zbytkem genu *als*. Homologie obou ramen (LR, PR) s okolím genu *als* v chromozomu zajišťuje účinnou homologní rekombinaci (obr. 20). Plasmidový konstrukt byl sestaven v elektrokompetentních buňkách *E. coli* SURE[®], následně přenesen do *E. coli* ET12567/pUZ8002 a odtud byl konjugován do kmene BCCO10 1636.



Obr. 20 Zjednodušený model postupu při disruptci genu *als*. (A) Operon divokého typu kmene BCCO10 1636 s následným pořadím genů: *lcfcal* (*all*), *als*, *ams*. (B) Očekávaná podoba výsledného konstruktů s vloženou rezistenční kazetou namísto *als* genu. Dochází k homologní rekombinaci mezi plasmidem a chromozomem divokého typu kmene BCCO10 1636. (C) Výsledná podoba operonu v chromozomu, kde byl gen *als* nahrazen rezistenční kazetou *aadA*.

Amplifikace levého a pravého ramene pomocí PCR a jejich vložení do vektoru

Pro amplifikaci levého ramene (LR) a pravého ramene (PR) byly navrženy následující dvě dvojice primerů (forward a reverse):

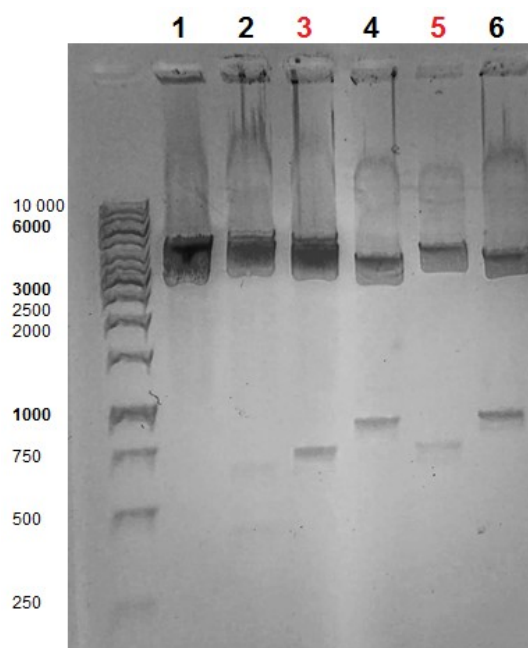
1636LR-F	GCA GAC CTC TTC GCC GTA GC	PCR amplifikace levého ramene	Očekávaná velikost: 1 491 bp
1636LR-R	TCT GGG AGG AAC TGG GCT TG		
1636PR-F	CAC CGA GCT CTT CCA ACT CG	PCR amplifikace pravého ramene	Očekávaná velikost: 1 495 bp
1636PR-R	AGA TGC TCT CCG TCC GCT AC		

Tab. 6 Primery použité pro amplifikaci LR a PR kmene BCCO10 1636.

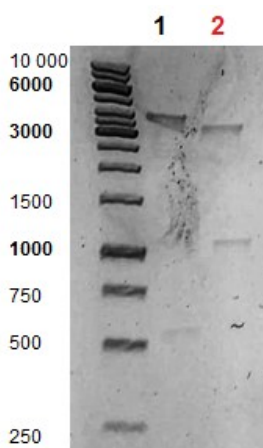
Amplifikace LR a PR proběhla pomocí PCR, kdy templátem byla chromozomální DNA izolovaná z divokého typu kmene BCCO10 1636 (viz kapitola 4.2.1). Produkty PCR reakce (5 μ l) byly nanесeny na gelovou elektroforézu pro ověření, zda reakce proběhla specificky a zda mají produkty požadovanou velikost. Následně byla provedena druhá elektroforéza, kde bylo nanесeno 20 μ l vzorku a požadované PCR fragmenty byly izolovány z agarózového gelu metodou Glass milk (viz kapitola 4.2.1). Jako vektor pro molekulární klonování byl použit plasmid pBluescript SK+ umožňující v *E. coli* SURE[®] modro-bílou selekci. Fragmenty LR a PR izolované z gelu, následně fosforylované na 5' koncích pomocí polynukleotid kinázy (PNK) a zatupené pomocí Klenow fragmentu, byly vloženy zvlášť samostatně do vektoru pomocí klonování natupo (viz kapitola 4.2.2). Fosforylované LR bylo vloženo do *Sma*I štěpeného místa v pBluescript SK+ a fosforylované PR bylo vloženo do *Eco*RV štěpeného místa pBluescript SK+ (obr. 21). Štěpení 1 μ l pBluescript SK+ pro následné vložení LR probíhalo za použití 1 μ l RE *Sma*I v celkovém objemu 10 μ l při teplotě 30 °C po dobu 1,5 h. Štěpení 0,5 μ g pBlueScript SK+ pro následné vložení PR probíhalo za použití 1 μ l RE *Eco*RV. 5'-konce vektoru byly defosforylovány pomocí FastAP alkalické fosfatasy a ligovány s LR či PR (viz kapitola 4.2.2).

orientace. Konstrukt o velikosti 4 452 bp obsahující LR byl označen p1636LR a konstrukt o velikosti 4 456 bp obsahující PR p1636PR.

Pro restrikční analýzu p1636LR byly použity enzymy *Bgl*II a *Xba*I za vzniku fragmentů o velikosti 722 bp a 3 730 bp (obr. 22). Pro restrikční analýzu p1636PR byl použit enzym *Kpn*I za vzniku fragmentů 1 035 bp a 3 421 bp (obr. 23).



Obr. 22 Restrikční analýza konstruktu p1636LR za použití RE *Bgl*II a *Xba*I za vzniku fragmentů o velikosti 722 bp a 3 730 bp. Pozitivní jsou vzorky **3** a **5**, přičemž 4 a 6 jsou orientovány opačně. Jako velikostní standard byl použit Thermo Scientific™ GeneRuler™, viz kapitola 4.1.8.

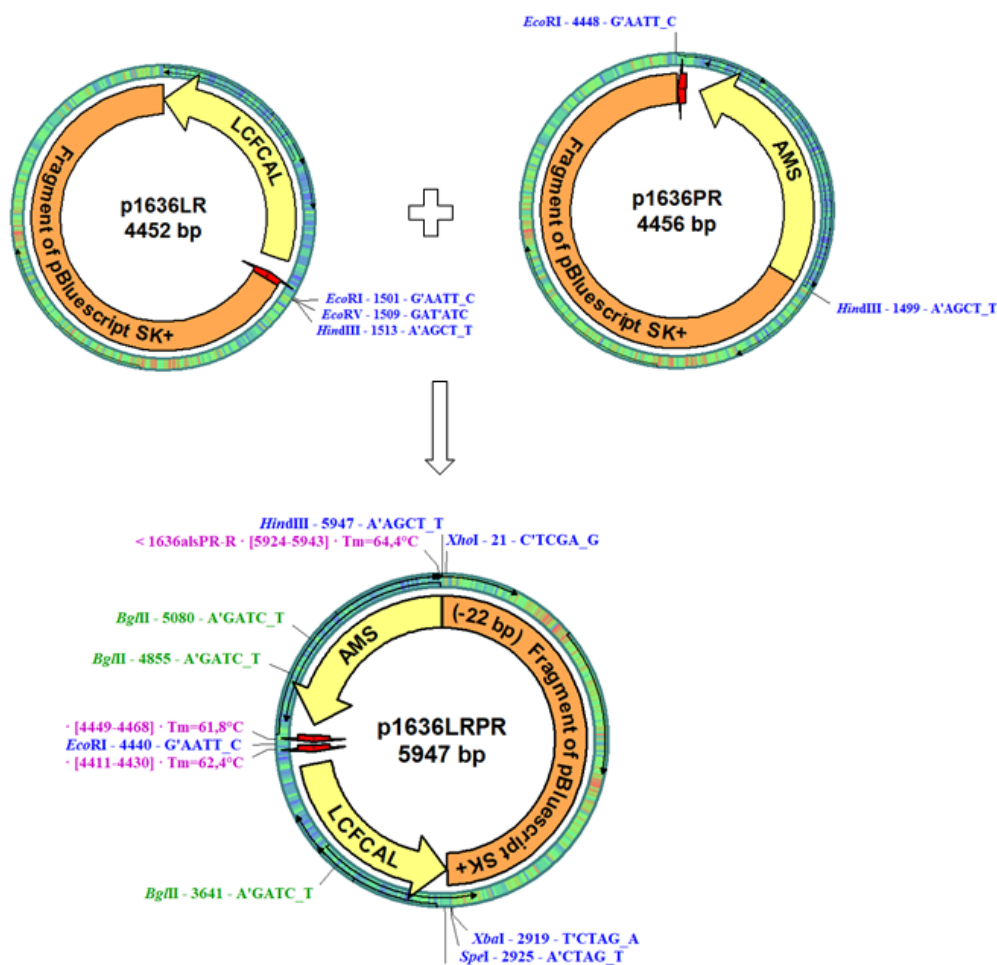


Popis obrázku na další straně

Obr. 23 Restrikční analýza konstruktů p1636PR za použití RE *KpnI* za vzniku fragmentů 1 035 bp a 3 421 bp. Vzorek 2 je pozitivní, vzorek 1 je v opačné orientaci. Jako velikostní standard byl použit Thermo Scientific™ GeneRuler™, viz kapitola 4.1.8.

Spojení levého a pravého ramene v jeden konstrukt

Obě ramena byla k sobě v dalším kroku spojena ve správné orientaci metodami molekulárního klonování (viz kapitola 4.2.2), výsledný konstrukt o velikosti 5 947 bp byl nazván p1636LRPR (obr. 24): do p1636LR štěpeného enzymy *EcoRI* a *HindIII* byl vložen fragment *EcoRI-HindIII* z p1636PR nesoucí pravé rameno.

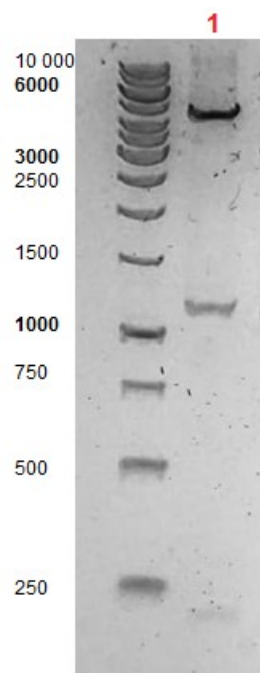


Obr. 24 Návrh klonovacího postupu spojení p1636LR a p1636PR ve výsledný konstrukt p1636LRPR o velikosti 5 947 bp.

Po ligaci byla směs ještě jednou 1 h při 37 °C štěpena 1 µl *EcoRV* RE. Při štěpení vektoru p1636LR pomocí *EcoRI* a *HindIII* došlo k vyštěpení krátké (12 bp) sekvence obsahující právě *EcoRV* štěpné místo. Tímto postupem jsme se efektivně zbavili všech plasmidů neobsahujících žádný vložený fragment. Buňky *E. coli* SURE® byly pomocí

elektroporace transformovány konstruktem p1636LRPR. Postup kultivace a izolace plasmidové DNA následoval stejně jako v kapitole 4.2.1.

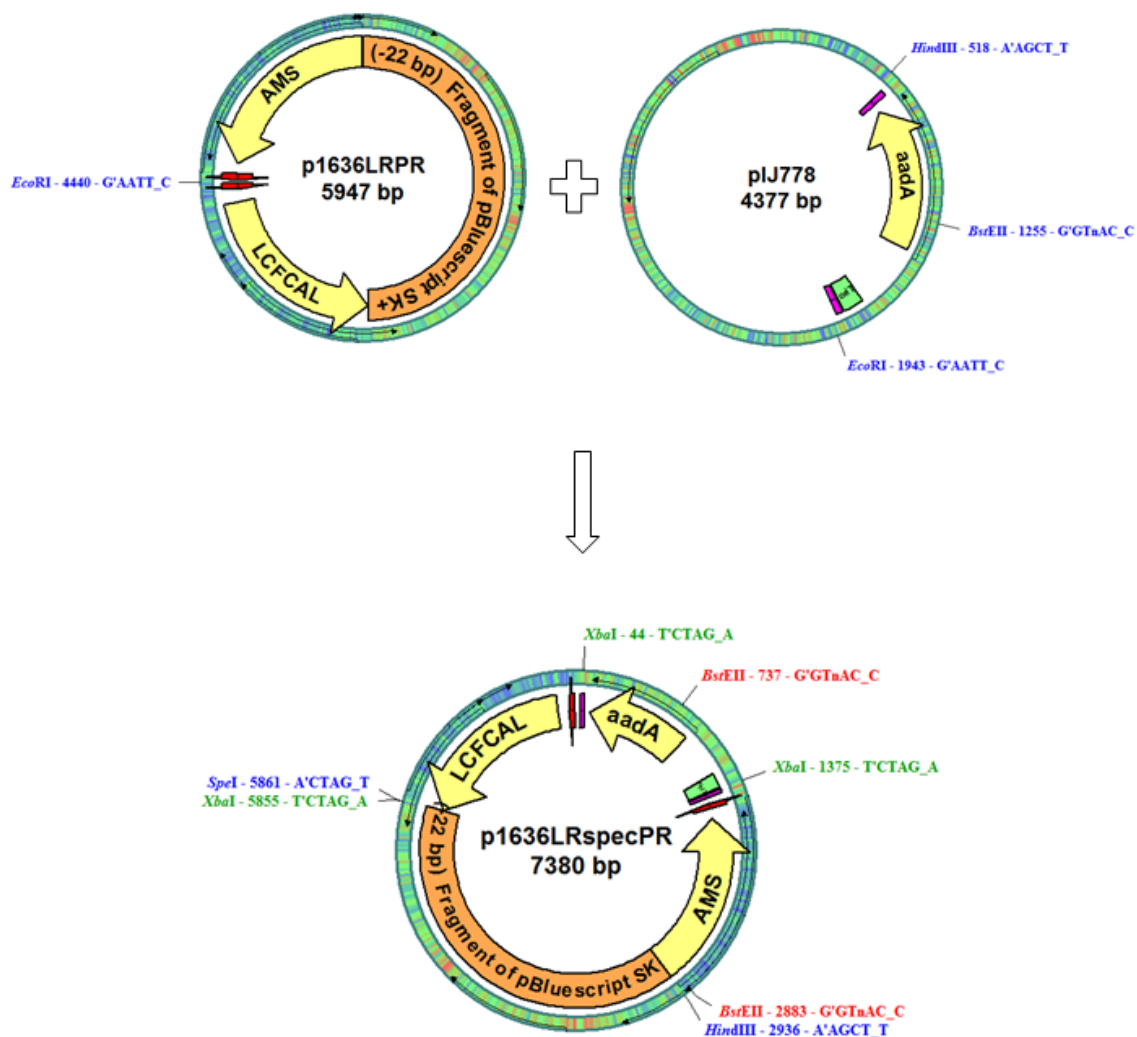
Izolovaný konstrukt byl opět podroben restrikční analýze pro zjištění přítomnosti fragmentu LR a jeho správné orientace. Štěpení probíhalo enzymem *Bgl*II a očekávány byly fragmenty o velikosti 225 bp, 1 214 bp a 4 508 bp (obr. 26).



Obr. 26 Restrikční analýza konstruktů p1636LRPR o velikosti 5 947 bp. Konstrukt byl štěpen enzymem *Bgl*II za vzniku fragmentů o velikosti 225 bp, 1 214 bp a 4 508 bp. Jako velikostní standard byl použit Thermo Scientific™ GeneRuler™, viz kapitola 4.1.8.

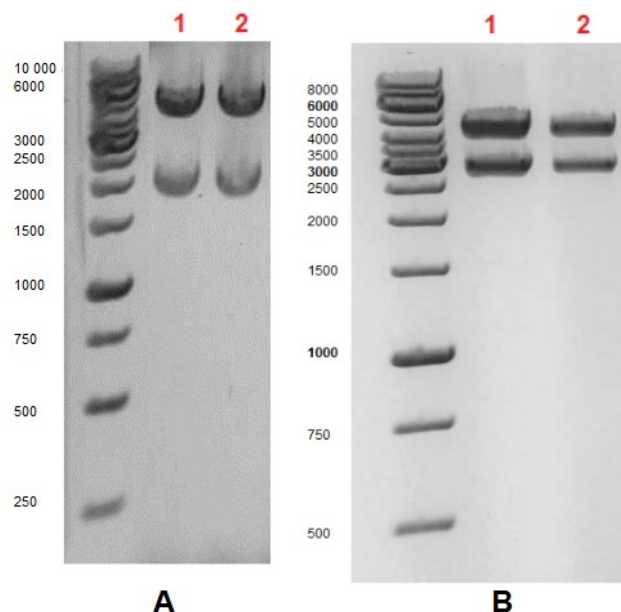
Vložení rezistenční kazety mezi levé a pravé rameno konstruktů

Mezi obě ramena LR a PR byla dále vložena rezistenční kazeta obsahující gen *aadA* pro rezistenci ke spektinomycinu a *oriT* umožňující konjugální přenos konstruktů mezi *E. coli* SURE[®] a kmenem BCCO10 1636 (obr. 27). Tato inzerční kazeta pocházela z plasmidu pIJ778 a byla vyštěpena restrikčními endonukleázami *Eco*RI a *Hind*III. Klonování probíhalo metodou klonování DNA fragmentu natupo (viz kapitola 4.2.2). Vzniklý konstrukt nesl název p1636LRspecPR a měl velikost 7 380 bp.



Obr. 27 Návrh klonovacího postupu pro p1636LRPR jako vektoru a pIJ778 jako donoru fragmentu obsahující gen *aadA* a *oriT*. Výsledný fragment p1636LRspecPR měl velikost 7 380 bp.

Restrikční analýza pro ověření přítomnosti inzerční kazety a její orientace ve vzniklém fragmentu byla provedena ve dvou štěpeních – jednou byl konstrukt štěpen pomocí RE *BstEII* (s očekávanými fragmenty 2 146 bp a 5 234 bp; obr. 28 A). Poté byl konstrukt štěpen dvojicí RE *SpeI* a *HindIII* (s očekávanými fragmenty 2 925 bp a 4 455 bp; obr. 28 B).

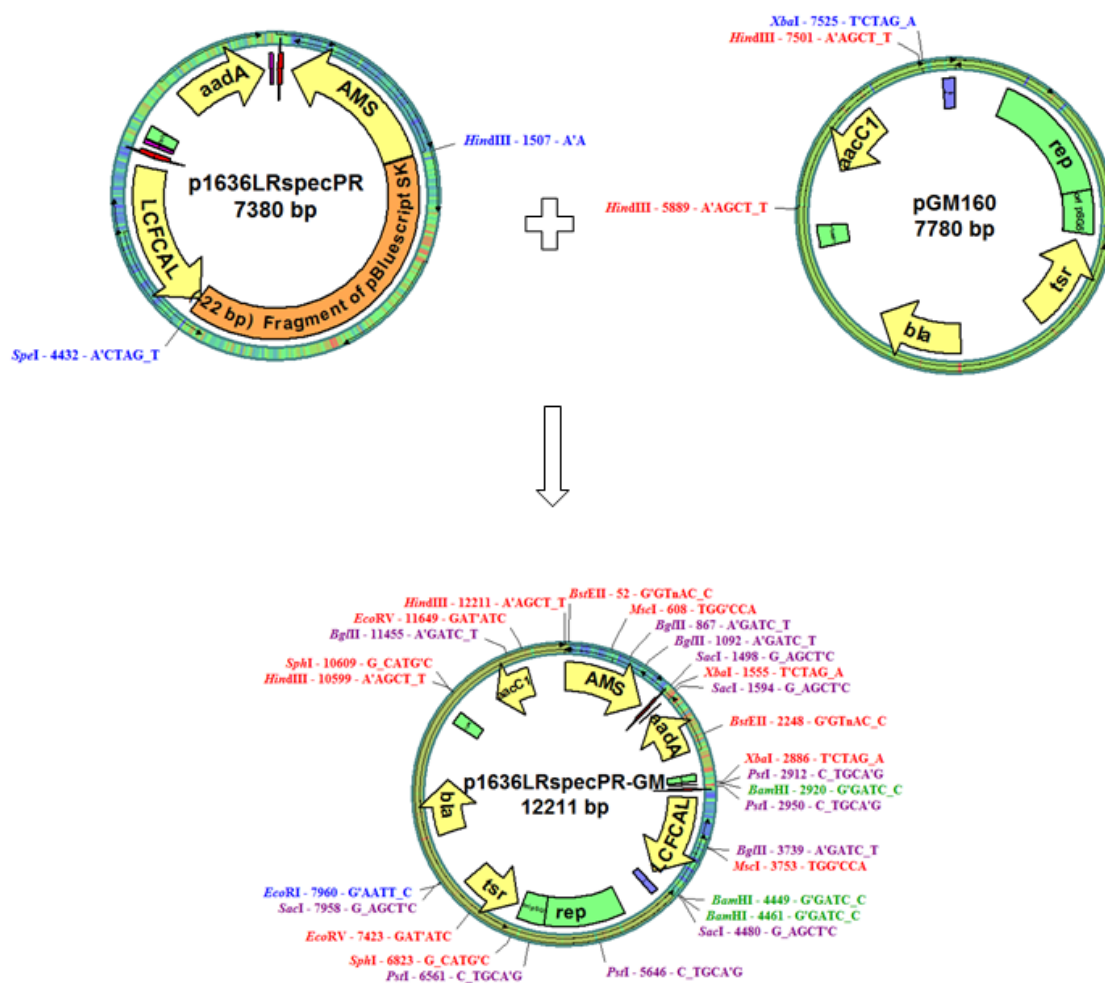


Obr. 28 (A) Restrikční analýza konstruktů p1636LRspecPR pomocí RE *BstEII*. Vzniklé fragmenty mají velikost 2 146 bp a 5 234 bp. (B) Restrikční analýza konstruktů p1636LRspecPR pomocí RE *SpeI* a *HindIII*. Vzniklé fragmenty mají velikost 2 925 bp a 4 455 bp. Jako velikostní standard byl použit Thermo Scientific™ GeneRuler™, viz kapitola 4.1.8.

Vytvoření finálního konstruktů určeného pro transformaci do kmene BCCO10 1636

Finální konstrukt byl tvořen fragmentem p1636LRspecPR a vektorem pGM160. Vektor pGM160 je multikopiový „shuttle“ (bifunkční) vektor s termosenzitivní replikací probíhající jak v *E. coli* tak ve streptomycetách (viz kapitola 4.1.2).

Konstrukt p1636LRspecPR byl štěpen pomocí RE *SpeI* a *HindIII*, vektor pGM160 byl štěpen enzymy *XbaI* a *HindIII*, očekávan byl vznik většího (6 144 bp) a menšího fragmentu (1 636 bp), který není pro funkci vektoru esenciální. pGM160 obsahuje 2 restrikční místa pro *HindIII* (*HindIII*₅₈₈₉ a *HindIII*₇₅₀₁; obr. 16) a návrh klonování předpokládal úplné štěpení (tedy vypadnutí 1 636 bp velkého fragmentu). Avšak při štěpení nedošlo k úplnému štěpení vektoru a po defosforylaci vektoru pomocí FastAP a ligaci fragmentu p1636LRspecPR do pGM160 došlo k vložení p1636LRspecPR do restrikčního místa *HindIII*₇₅₀₁. Vznikl tak větší konstrukt o velikosti 12 211 bp s názvem p1636LRspecPR-GM (obr. 29).



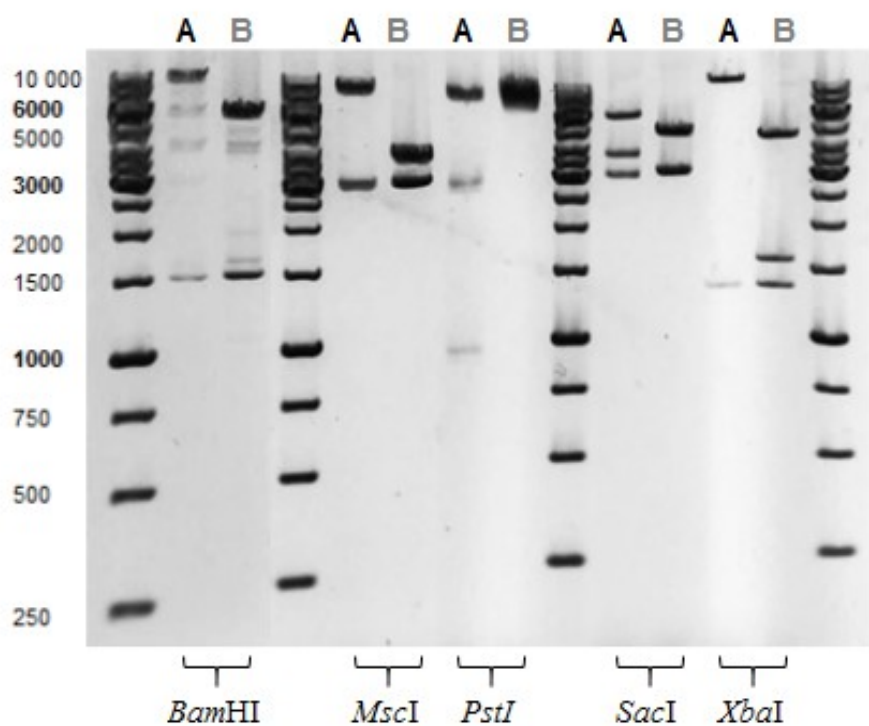
Obr. 29 Návrh klonovacího postupu pro p1636LRspecPR a pGM160 za vzniku finálního konstruktu o velikosti 12 211 bp nesoucí název p1636LRspecPR-GM.

Konstrukt p1636LRspecPR-GM byl transformován do buněk *E. coli* SURE[®], které byly poté vysety na Petriho misky obsahující LB médium jak se spektinomycinem, tak ampicilinem. Po izolaci kolonií proběhla izolace plasmidové DNA a její restrikční analýza.

Restrikční analýza (obr. 30) probíhala jak u p1636LRspecPR, tak u finálního konstruktu p1636LRspecPR-GM pro lepší porovnání, jelikož u vektoru pGM160 neznáme jeho kompletní DNA sekvenci, a nejsou tak známa všechna restrikční místa. Oba plasmidy byly podrobeny štěpení RE *Bam*HI, *Bst*EII, *Msc*I, *Sac*I a *Xba*I s předpokládanou tvorbou následujících fragmentů (tab. 7):

	<i>Bam</i> HI	<i>Msc</i> I	<i>Pst</i> I	<i>Sac</i> I	<i>Xba</i> I
p1636LRspecPR-GM A	12 bp 1 284 bp 10 670 bp	3 145 bp 9 066 bp	8 562 bp 2 696 bp 915 bp 38 bp	96 bp 2 886 bp 3 478 bp 5 751 bp	1 331 bp 10 880 bp
p1636LRspecPR B	1 529 bp 5 851 bp	3 145 bp 4 235 bp	38 bp 7 342 bp	96 bp 2 895 bp 4 389 bp	1 331 bp 1 575 bp 4 474 bp

Tab. 7 Předpokládané velikosti fragmentů u p1636LRspecPR a p1636LRspecPR-GM po restrikční analýze. A a B značí vzorek na obrázku 30.



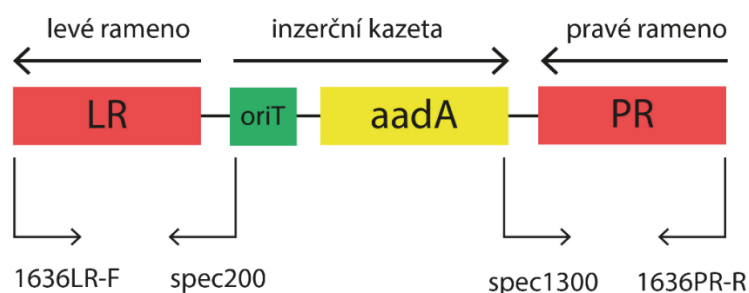
Obr. 30 Restrikční analýza p1636LRspecPR-GM (A) a p1636LRspecPR (B). Jako velikostní standard byl použit Thermo Scientific™ GeneRuler™, viz kapitola 4.1.8.

Přenos finálního konstruktu p1636LRspecPR-GM do kmene BCCO10 1636

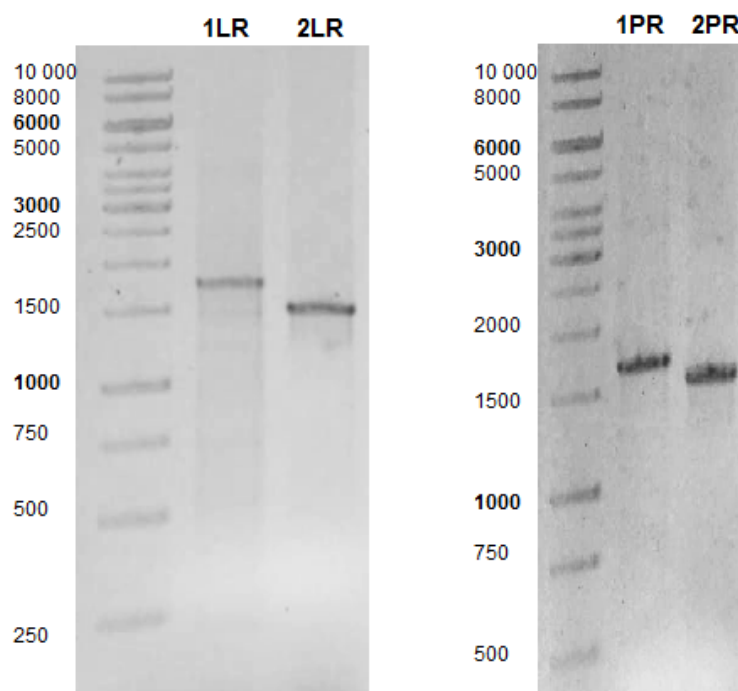
Prvním krokem byla transformace elektrokompetentního kmene *E. coli* ET12567/pUZ8002 konstruktem p1636LRspecPR-GM pomocí elektroporace.

Po transformaci *E. coli* ET12567/pUZ8002 konstruktem p1636LRspecPR-GM byl kmen kultivován v přítomnosti spektinomycinu, kanamycinu a chloramfenikolu. Přenos konstruktů z *E. coli* ET12567/pUZ8002 do BCCO10 1636 byl proveden konjugací (viz kapitola 4.2.3). Po izolaci 4 vyrostlých kolonií transformovaného kmene BCCO10 1636, byly kolonie opět rozočkovány na MS médium obsahující spektinomycin a kyselinu nalidixovou pro úplné vyčištění od zbylých *E. coli* ET12567/pUZ8002.

Z kolonií byla vybrána jedna, ze které byla izolována chromozomální DNA pomocí komerčního kitu Wizard Genomic DNA Purification Kit (viz kapitola 4.2.1). Pro ověření přítomnosti plasmidu byla provedena PCR reakce se dvěma kombinacemi primerů: 1636LR-F + spec200 a 1636PR-R + spec1300. Primery spec200 a spec1300 byly navrženy podle rezistenční kazety vložené mezi obě ramena obsahující gen pro rezistenci ke spektinomycinu. Nasedají uvnitř kazety a postupují v protisměru proti primerům 1636LR-F a 1636PR-R (obr. 31). PCR produkty byly naneseny na gelovou elektroforézu. Pro srovnání byly naneseny do vedlejší jamky amplifikované levé a pravé rameno. Produkt s primery 1636LR-F + spec200 a s primery 1636PR-R + spec1300 by měl být přibližně o 200 bp větší než produkt 1636LR-F + 1636LR-R (levé rameno) a než produkt 1636PR-F + 1636PR-R (pravé rameno). Výsledek vyhodnocení elektroforézy je na obr. 32.



Obr. 31 Schéma nasedání primerů 1636LR-F (forward) + spec200 (reverse) a spec1300 (forward) + 1636PR-R (reverse). Šípky nahoře ukazují orientaci ramen a inzerční kazety.



Obr. 32 Produkty PCR. Na obrázku vlevo LR1 je produkt PCR s použitím primerů 1636LR-F a spec200 o velikosti 1 706 bp. 2LR je produktem za použití primerů 1636LR-F a 1636LR-R čili amplifikované levé rameno kmene BCCO10 1636 o velikosti 1 491 bp. Vpravo 1PR je produkt PCR s použitím primerů spec1300 a 1636PR-R o velikosti 1 594 bp. 2PR je PCR produktem za použití primerů 1636PR-F a 1636PR-R čili amplifikované pravé rameno o velikosti 1 495 bp. Jako velikostní standard byl použit Thermo Scientific™ GeneRuler™, viz kapitola 4.1.8.

Integrace inzerční kazety do chromozomu kmene BCCO10 1636 a disrupce genu *als* v chromozomu

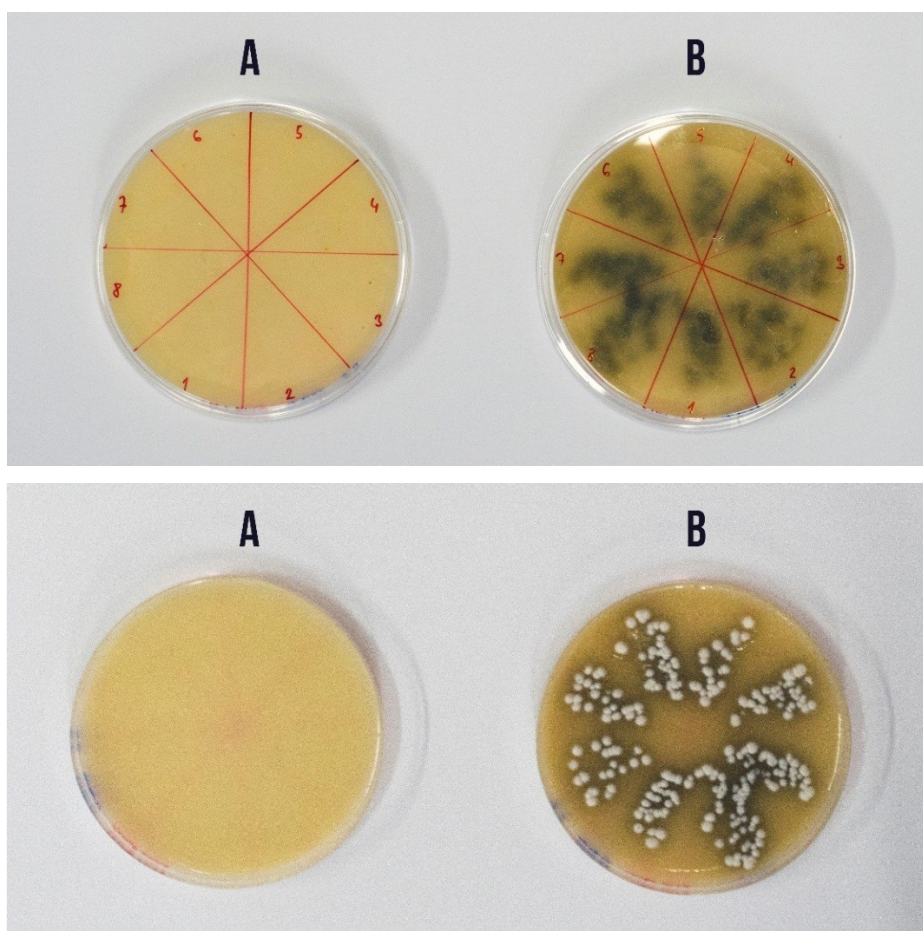
Tento krok vedl k vytvoření delečního mutanta kmene BCCO10 1636 s pracovním označením 1636 Δ *als*.

Konstrukt p1636LRspecPR-GM byl tvořen kromě inzerční kazety a dvou ramen (LR, PR) také zbytkem vektoru pGM160.

Kmen BCCO10 1636 obsahující plasmid p1636LRspecPR-GM byl zaočkován do prolamované Erlenmeyerovy baňky obsahující 80 ml YEME média se spektinomycinem. Ta byla na dva dny umístěna do třepačky s teplotou permissivní pro replikaci plasmidu - 30 °C při 220 rpm. Po uplynutí 48 h byla baňka přenesena do třepačky s teplotou 39 °C, nepermissivní pro replikaci plasmidu. Přítomnost spektinomycinu vytváří selekční tlak na integraci kazety do chromozomu pomocí homologní rekombinace. Ta se děje mezi sekvencí LR (genu *all*) a PR (genu *ams*)

konstruktů a mezi sekvencí genu *all* a *ams* na chromozomu kmene BCCO10 1636. Dojde ke ztrátě genu *als* a jeho nahrazení genem pro rezistenci ke spektinomycinu.

Po 24 hodinách kultivace při 39 °C a dále pravidelně v dalších dnech byl proveden výsev tak, že byl odebrán 1 ml kultury a vyset na Petriho misky obsahující MS médium se spektinomycinem a na misky obsahující MS médium s thiostreptonem v ředění 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} a 10^{-8} . Misky byly kultivovány týden v termostatu při teplotě 30 °C. Poté bylo izolováno 8 kolonií z misek s MS médiem a spektinomycinem, kdy na jejich protějšku (MS médium + thiostrepton) ze stejného dne a stejného ředění žádné kolonie nebyly. To znamenalo, že došlo k homologní rekombinaci mezi konstruktem p1636LRspecPR-GM a chromozomem aztrátou zbytku vektoru pGM160 přišel kmen i o rezistenci na thiostrepton. Naopak rezistence na spektinomycin zůstává, jelikož se inzerční kazeta integrovala do chromozomu. Těchto 8 kolonií bylo opět rozočkováno jednou na Petriho misku obsahující MS a spektinomycin a misku obsahující MS a thiostrepton. Všechny osm vyrostlo v přítomnosti spektinomycinu, ale k thiostreptonu byly citlivé (obr. 33).



Popis obrázku na další straně

Obr. 33 (A) Petriho misky obsahující MS médium s thiostreptonem. Mutantní kmen BCCO10 1636 (pracovně Δ 1636) s integrovanou inzerční kazetou v chromozomu přichází, kvůli ztrátě zbytku konstruktu, o rezistenci na thiostrepton. Thio^R se nacházela ve vektoru pGM160, který tvořil právě podstatnou část konstrukt p1636LRspecPR-GM. (B) Petriho misky obsahující MS médium se spektinomycinem a rozočkováných 8 kolonií. Tyto kolonie mají díky integrované inzerční kazetě v chromozomu rezistenci na spektinomycin a zároveň u nich došlo k disrupci genu *als*. Všechny tedy naznačují, že integrace inzerční kazety do chromozomu proběhla úspěšně.

Spory z vybrané kolonie byly ještě několikrát rozočkovány na médium se spektinomycinem (vždy pro kontrolu i na médium s thiostreptonem), abychom se zbavili případné kontaminace divokého kmene. Streptomycety totiž mají polyploidní mycelia a jediným buněčným typem, který je zaručeně haploidní, jsou spory. U polyploidních vegetativních mycelií je možné, že rekombinace neproběhne u všech kopií genomu a v populaci se tak mohou stále vyskytovat buňky s WT genomem. Proto jsme při PCR kontrole mutantního kmene kontrolovali i nepřítomnost PCR fragmentů typických pro WT. Z jedné kolonie byla potom izolována chromozomální DNA pomocí komerčního kitu Wizard Genomic DNA Purification Kit. Následovaly tři PCR, kdy templátem byla izolovaná chromozomální DNA z 1636 Δ *als* a DNA izolovaná z divokého typu (WT) kmene BCCO10 1636. PCR probíhaly následně s těmito kombinacemi primerů (tab. 8):

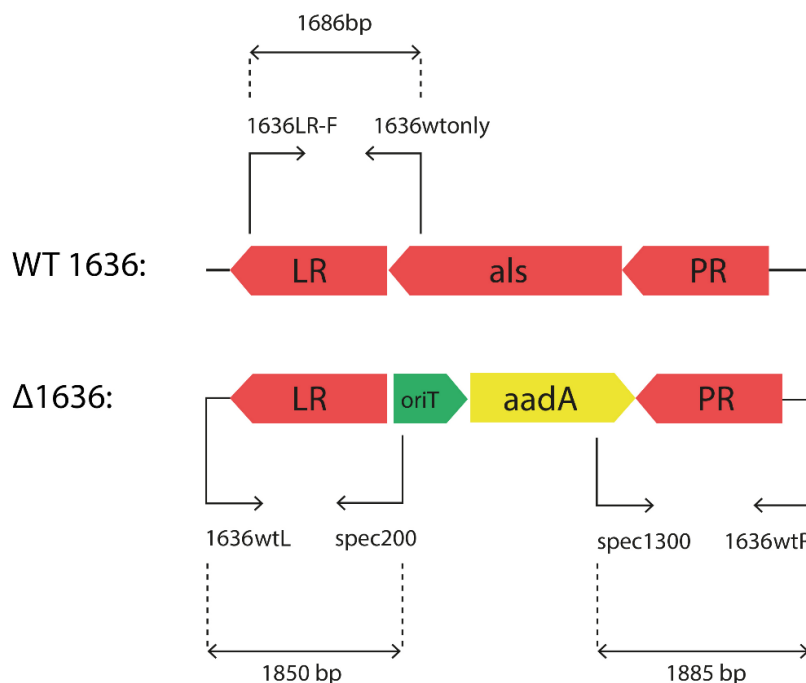
Reakce	Použité primery	Velikost produktu u 1636 Δ <i>als</i>	Velikost produktu u 1636 WT
1.	1636LR-F + 1636wtonly	-	1 686 bp
2.	1636wtL + spec200	1 850 bp	-
3.	1636wtR + spec1300	1 885 bp	-

Tab. 8 Rozpis tří PCR s kombinacemi primerů a očekávanými velikostmi produktů.

V případě první reakce byly primery navrženy tak, aby nasedaly pouze na DNA divokého typu obsahující *als* gen. Bylo potřeba ověřit, že produkt vzniká pouze u WT 1636 a ne u 1636 Δ *als*, což by znamenalo, že delece genu *als* nebyla úspěšná.

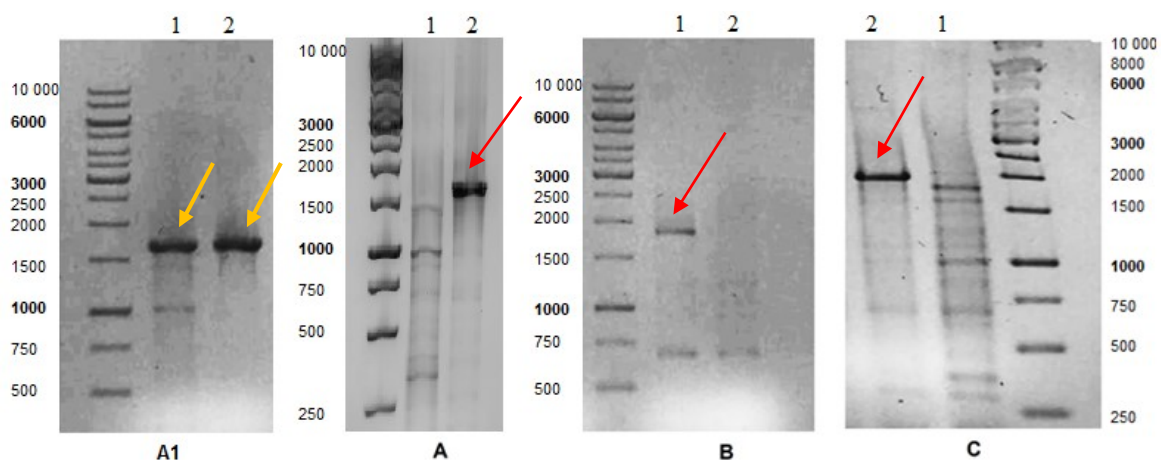
V případě druhé a třetí reakce byly primery navrženy tak, aby nasedaly dále v chromozomu za levým i pravým ramenem divokého kmene i delečního, zato primery spec200 a spec1300 jsou specifické pouze pro inzerční kazetu. Tento způsob navržení primerů umožňuje odlišit i případné „přežívání“ nezaintegrovaného plasmidu v buňce, respektive plasmidu, který se zaintegroval celý a nedošlo k druhotné rekombinaci

a vyštěpení kopie s *als* genem výměnou za inzerční kazetu. Tím pádem nemůže vzniknout PCR produkt ani u divokého, ani u volného plasmidu, ani u zaintegrováného celého plasmidu. V případě zaintegrování celého plasmidu (bez výměny *als* genu za *addA* gen) vznikne pouze jeden z fragmentů buďto u druhé, nebo třetí reakce. V tomto případě DNA WT 1636 sloužila jako negativní kontrola. U 1636 Δ *als* se naopak potvrdila přítomnost zaintegrované inzerční kazety přímo v chromozomu (obr. 34).



Obr. 34 Schéma nasedání primerů na DNA divokého kmene a na DNA mutantního kmene BCCO10 1636.

Produkty PCR byly naneseny na agarózovou gelovou elektroforézu (obr. 35).



Obr. 35 Analýza PCR na agarózové gelové elektroforéze. 1=1636 Δ *als*, 2=WT 1636. (A1) Jedná se o 1. reakci za použití primerů 1636LR-F + 1636wtonly. Produkt byl očekáván pouze u WT

1636 o velikosti 1 686 bp, ale objevil se jak u WT 1636, tak u 1636 Δ als, což znamenalo, že se jedná o deleční kmen s příměsí WT buněk. (A) 1. reakce za použití primerů 1636LR-F + 1636wtonly. Deleční kmen se podařilo od WT buněk vyčistit a produkt se nachází pouze u WT. (B) 2. reakce za použití primerů 1636wtL + spec200. WT slouží jako negativní kontrola, u 1636 Δ als je přítomnost inzerční kazety v chromozomu potvrzena produktem o velikosti 1 850 bp. (C) 3. reakce za použití primeru 1636wtR + spec1300. WT slouží jako negativní kontrola, u 1636 Δ als je přítomnost inzerční kazety v chromozomu potvrzena produktem o velikosti 1 885 bp. Jako velikostní standard byl použit Thermo Scientific™ GeneRuler™, viz kapitola 4.1.8.

5.4 Příprava nadprodukčního kmene BCCO10 1636

Pro přípravu nadprodukčního kmene byl použit plasmid pALS4K, který s dovolením poskytl Mgr. Kateřina Petříčková, Ph.D. Tento plasmid nese gen *als* z producenta asukamycinu *S. nodosus* ssp. *asukaensis* pod silným konstitutivním promotorem *ermE**.

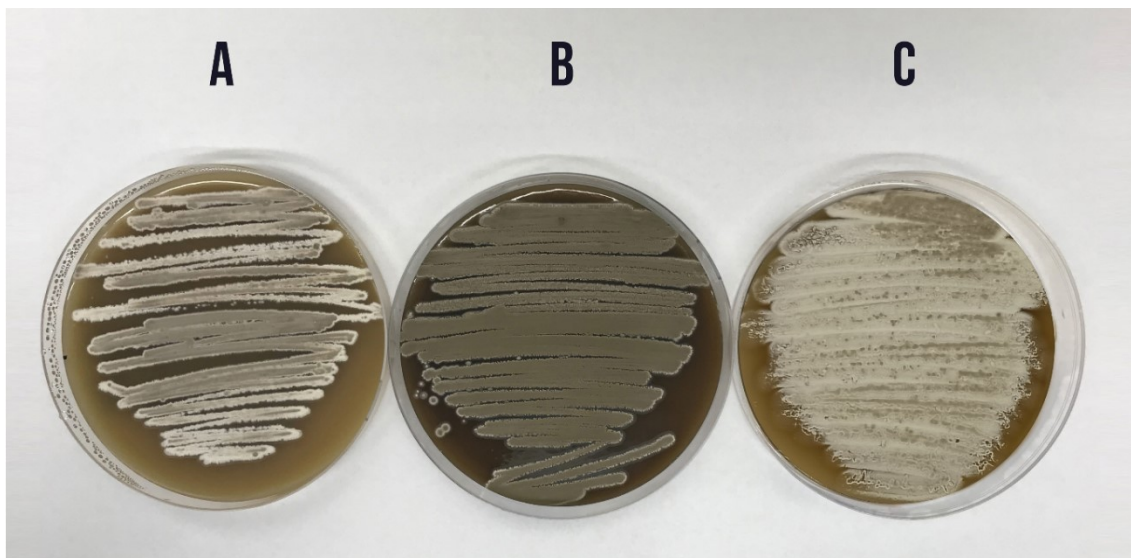
Plasmid pALS4K byl nejdříve elektroporací transformován do elektrokompetentních buněk *E. coli* ET12567/pUZ8002. Buňky byly vysety na LB médium obsahující apramycin, kanamycin a chloramfenikol. U buněk byla izolována plasmidová DNA a přítomnost plasmidu byla ověřena na agarózové gelové elektroforéze. Jako standard k porovnání sloužil původní plasmid. Poté byla kolonie buněk *E. coli* ET12567/pUZ8002 nesoucí plasmid pALS4K kultivována v tekutém LB médiu a byla provedena konjugace (viz kapitola 4.2.3) mezi *E. coli* ET12567/pUZ8002/pALS4K a mezi divokým typem kmene BCCO10 1636.

5.5 Analýza extraktů sekundárních metabolitů kmene BCCO10 1636

Analýza extraktů sekundárních metabolitů kmene BCCO10 1636 probíhala pomocí TLC, biologického testu a pomocí LC-MS. LC-MS analýza byla provedena panem Ing. Davidem Kahounem, Ph.D. při Jihočeské univerzitě v Českých Budějovicích. Postup extrakce a všech analýz je popsán v kapitole 4.2.4.

Pro TLC analýzu bylo potřeba zhotovit extrakty sekundárních metabolitů z divokého typu kmene BCCO10 1636 (WT 1636), z nadprodukčního kmene BCCO10 1636 obsahující plasmid pALS4K (1636+pALS4K) a z delečního kmene BCCO10 1636 (1636 Δ als) (Obr. 36). Kmen 1636 Δ als se době provádění analýz ještě nepodařilo zbavit příměsí WT buněk, proto byl tento kmen vždy pro extrakci kultivován v médiu obsahujícím spektinomycin pro minimalizaci přeživších WT buněk mycelia.

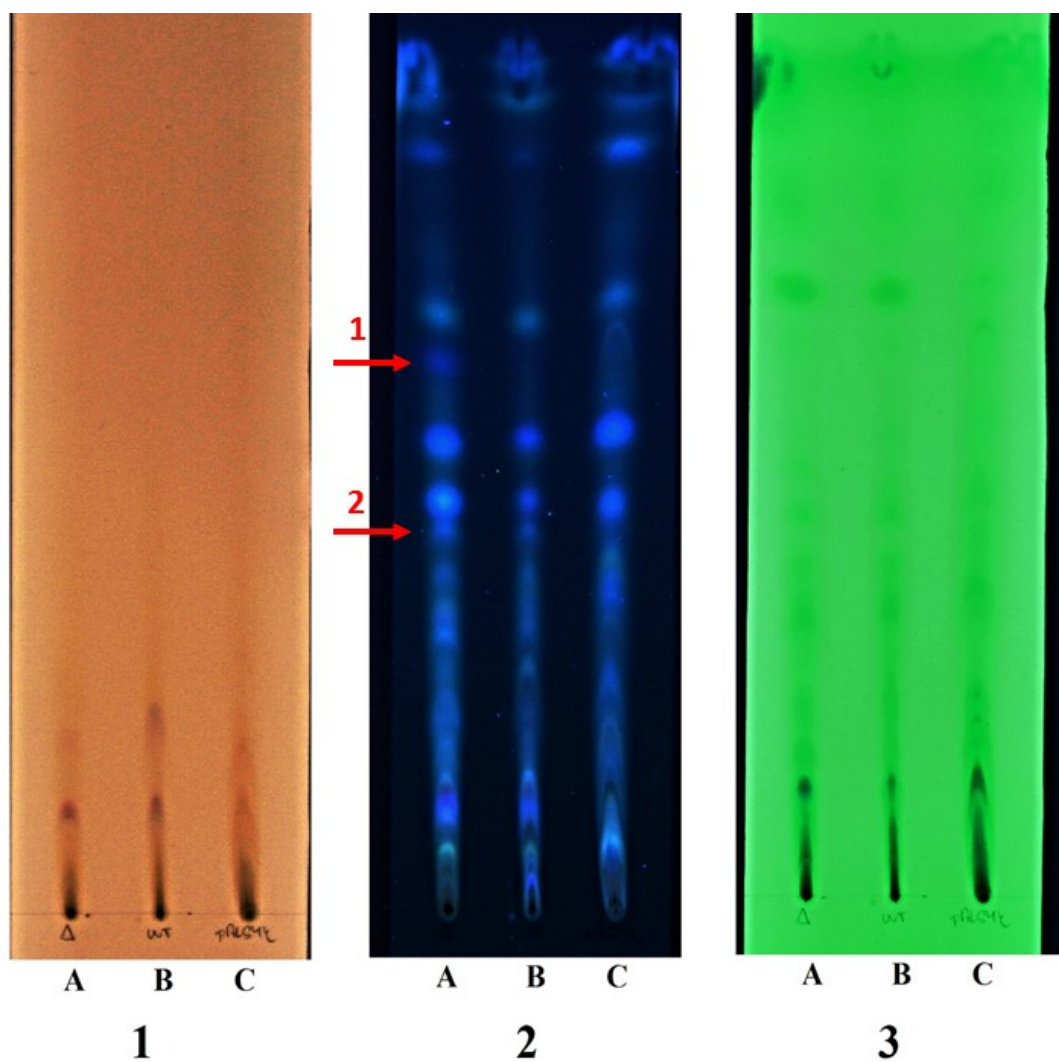
Spektinomycin se jako antibiotikum řadí do skupiny aminoglykosidů, tudíž jeho přítomnost v extraktu nemá vliv na průběh TLC, jelikož se v soustavě nepolárních rozpouštědel nepohybuje. Kmeny byly pro extrakci kultivovány v GYM médiu, kde byla v jenom případě jako zdroj cukrů použita **glukóza** a v druhém případě **glycerol**.



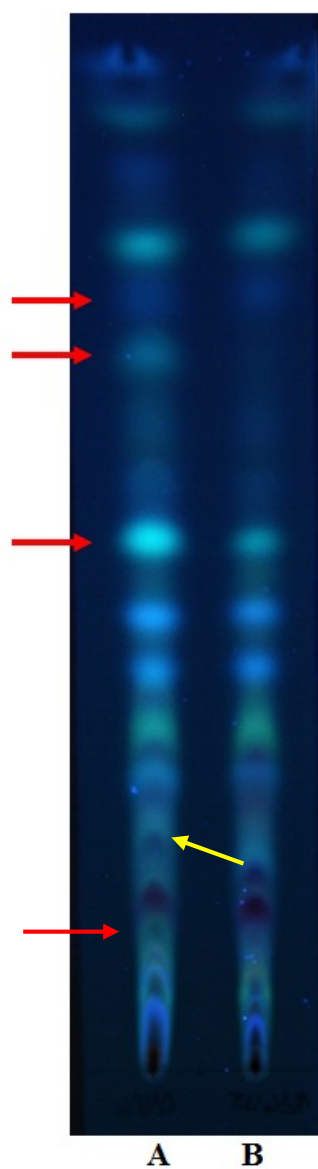
Obr. 36 (A) Divoký typ kmene BCCO10 1636 na MS médiu. (B) Nadprodukční kmen BCCO10 1636 obsahující plasmid pALS4K na MS médiu s apramycinem. (C) Deleční kmen BCCO10 1636 s buňkami obsahujícími DNA s deletovaným genem *als*, místo něhož obsahuje inzerční kazetu s rezistencí na spektinomycin. MS médium se spektinomycinem.

5.5.1 Analýza kmene BCCO10 1636 kultivovaného v GYM médiu s glycerolem

Sekundárních metabolity kmene BCCO10 1636, fermentujícího v GYM médiu obsahující glycerol, byly extrahovány nepolárními rozpouštědly (aceton, ethylacetát) a rozpuštěny v chloroformu. Na TLC desku byly extrakty nanесeny v objemu 25 μ l jako je popsáno v kapitole 4.2.4 ve dvou provedeních. Jedna TLC deska byla použita pro detekci sekundárních metabolitů při ozáření krátkovlnným a dlouhovlnným UV světlem (obr. 37 a obr. 38) a druhá TLC deska byla použita pro biologický test (obr. 39). Manumyciny totiž obsahují konjugované vazby, které absorbují UV světlo, a navíc C_5N jednotka UV světlo absorbuje také. I přesto, že Δ 1636 obsahuje v myceliu i buňky WT, je na TLC zřejmé, že ke změnám v produkci sekundárních metabolitů došlo.



Obr. 37 TLC analýza extraktů BCCO10 1636 fermentujícího v GYM médiu obsahujícího **glycerol**. A = deleční kmen 1636 Δ *als*, B = divoký typ, C = nadprodukční kmen. (1) Fotografie na denním světle. (2) Fotografie TLC desky ozářené UV světlem o vlnové délce 366 nm. Šipka 1 zobrazuje skvrnu nenacházející se v žádném z ostatních extraktů. Šipka 2 zobrazuje skvrnu, která je viditelná u WT a mutanta, ale nikoliv u nadprodukčního kmene. (3) Fotografie TLC desky ozářené UV světlem o vlnové délce 254 nm.

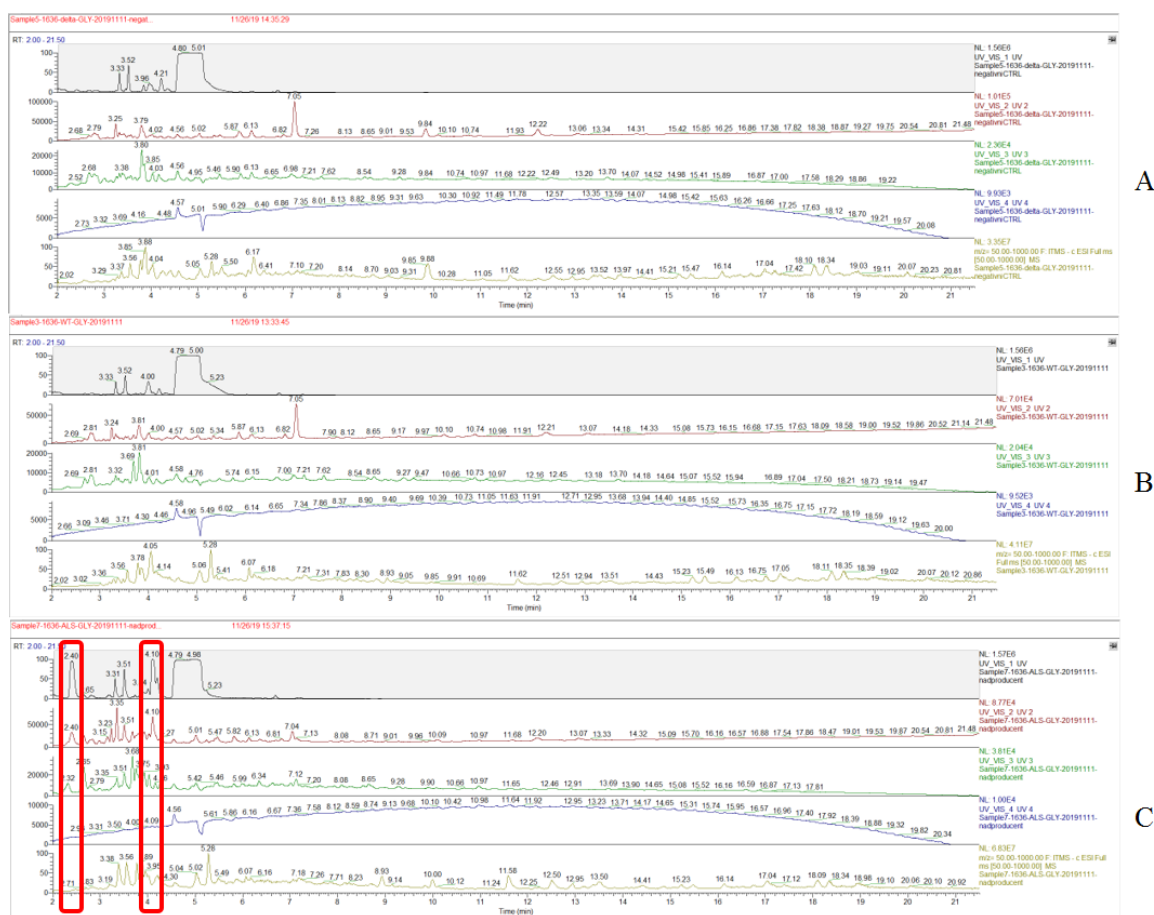


Obr. 38 TLC analýza extraktů BCCO10 1636 fermentujícího v GYM médiu obsahujícího **glycerol** provedena znovu, vztlínání mobilní fáze tentokrát probíhalo na delší TLC desce pro úplné rozložení skvrn. A = 1636 Δ *als*, B = WT. Šipky označují oblasti u 1636 Δ *als*, které vznikly nově oproti WT, jejich produkce byla posílena anebo došlo k jejich posunu vůči druhému vzorku.



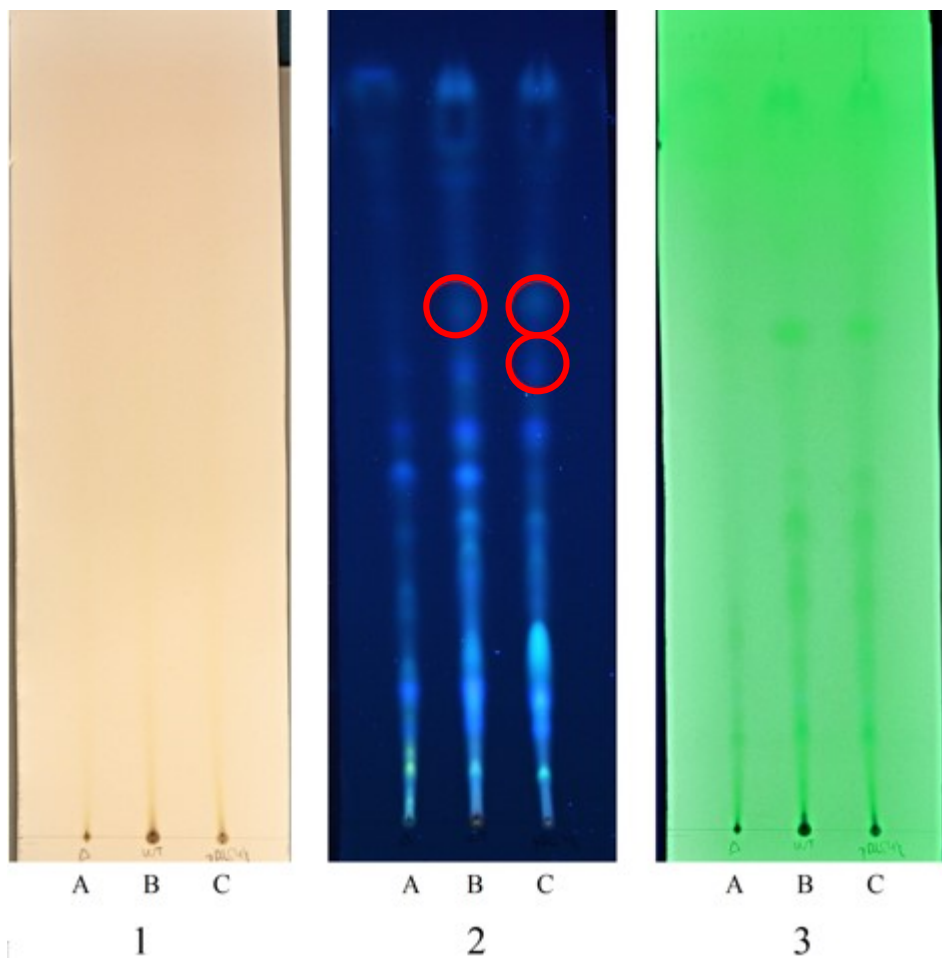
Obr. 39 Biologický test extraktů kmene BCCO10 1636 fermentujícího v GYM médiu obsahujícím **glyrecol**. A = deleční kmen 1636 Δ *als*, B = divoký typ WT, C = nadprodukční kmen.

Principem LC-MS analýzy v našem případě bylo porovnávání extraktů kmenů BCCO10 1636 mezi sebou. Při srovnání extraktů WT a kmene obsahujícího plasmid pALS4K bylo očekáváno posílení produkce látek obsahujících C₅N jednotku. Deleční kmen 1636 Δ *als* byl použit jako negativní kontrola.

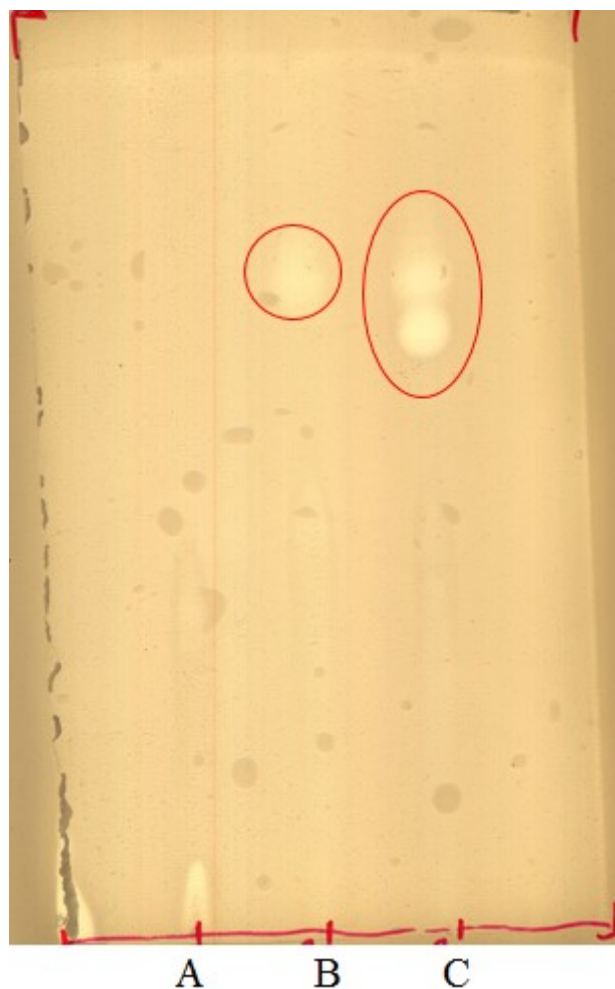


Obr. 40 LC-MS analýza extraktů kmene BCCO10 1636 v negativním módu. A = LC-MS spektrum extraktu delečního kmene 1636Δ*als*, B = LC-MS spektrum extraktu divokého typu, C = LC-MS spektrum extraktu nadprodukčního kmene. Na chromatogramu můžeme vidět píky v UV oblasti v 2,40 a v 4,10 minutě.

Sloučeniny jako colabomycin E, asukamycin A či manumycin A mají za daných podmínek při LC-MS analýze retenční čas v oblasti 12 – 16 min a velikost hmotnosti 500 – 600 m/z. Proto byl proveden full scan v retenční časové oblasti 10 – 15 min pro sloučeniny o hmotnosti 450 – 700 m/z, což je oblast manumycinů (obr. 41). Full scan umožňuje sledovat kvalitativní složení vzorku. Umožňuje skenování v hmotnostním rozsahu od nejmenších fragmentů sloučeniny po největší.



Obr. 42 TLC analýza extraktů BCCO10 1636 fermentujícího v GYM médiu obsahujícího **glukózu**. A = deleční kmen 1636 Δ *als*, B = divoký typ, C = nadprodukční kmen. (1) Fotografie na denním světle. (2) Fotografie TLC desky ozářené UV světlem o vlnové délce 366 nm. V kroužku jsou oblasti, které pravděpodobně tvoří inhibiční zóny na biologickém testu (3) Fotografie TLC desky ozářené UV světlem o vlnové délce 254 nm.



Obr. 43 Biologický test extraktů kmene BCCO10 1636 fermentujícího v GYM médiu obsahujícím **glukózu**. A = deleční kmen 1636 Δ *als*, B = divoký typ, C = nadprodukční kmen. V kroužku jsou zvýrazněny inhibiční zóny. Lze pozorovat, že extrakt nadprodukčního kmene způsobuje jednu inhibiční zónu oproti WT navíc. Inhibiční zóna u A na startovací čáře pravděpodobně představuje inhibici růstu způsobenou spektinomycinem, spolu se kterým byl deleční kmen inkubován v GYM médiu.

Principem LC-MS analýzy v našem případě bylo porovnávání extraktů kmenů BCCO10 1636 mezi sebou. Při srovnání extraktů WT a kmene obsahujícího plasmid pALS4K bylo očekáváno posílení produkce látek obsahujících C₅N jednotku. Deleční kmen 1636 Δ *als* byl použit jako negativní kontrola (obr. 44).



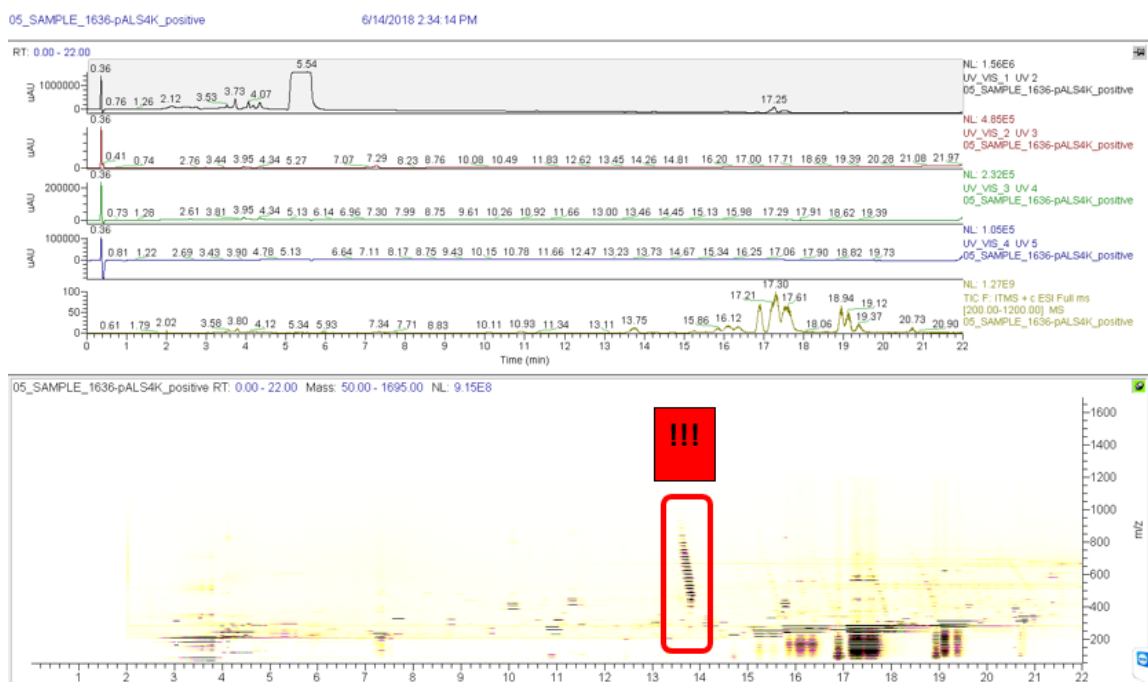
Obr. 44 LC-MS analýza extraktů kmene BCC010 1636 v pozitivním módu. A = LC-MS spektrum extraktu delecčního kmene 1636 Δ als, B = LC-MS spektrum extraktu divokého typu, C = LC-MS spektrum extraktu nadprodukčního kmene. V červeném rámečku můžeme ve 20,28 minutě u divokého a nadprodukčního kmene pozorovat výrazný pík, který u vzorku delecčního kmene chybí.

Ve vzorku pocházejícího z 1636 + pALS4K byl v negativním módu ionizace pozorován pík v hodnotě 6,14 min (obr. 45), který je opět výrazný u WT a nadprodukčního kmene, u dekečního kmene chybí.



Obr. 45 LC-MS analýza extraktů kmene BCCO10 1636 v negativním módu. A = LC-MS spektrum extraktu delecčního kmene 1636 Δ als, B = LC-MS spektrum extraktu divokého typu, C = LC-MS spektrum extraktu nadprodukčního kmene. Na chromatogramu můžeme vidět pík v UV oblasti v 6,14 minutě.

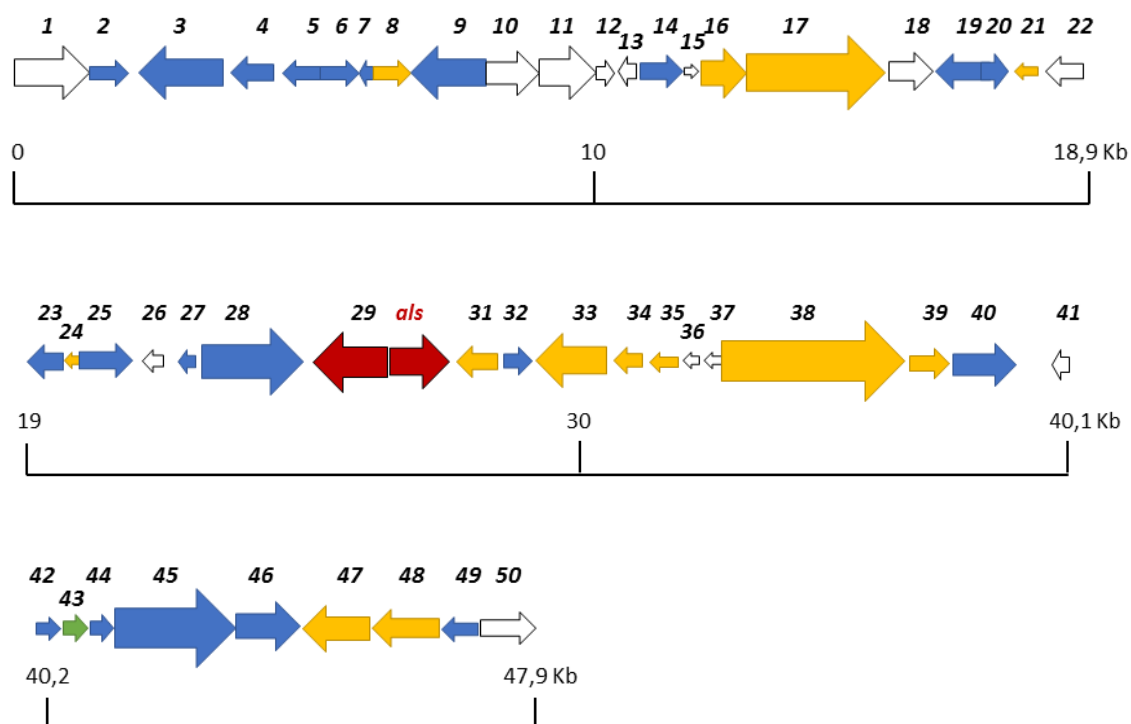
U vzorku 1636 + pALS4K byla rovněž v čase 13,75 min pozorována plejáda nových sloučenin (obr. 46). Tyto látky mají retenční čas 13,9 min a mají podobnou afinitu ke stacionární fázi (retenční čas manumycinu A je 14,9 min), ale bohužel vykazují velice nízkou absorpenci při vlnových délkách 200 a 250 nm. Vzhledem k citlivosti metody by se mohlo se jednat o kontaminaci vzorku ftaláty z plastových pomůcek.



Obr. 46 LC-MS analýza extraktu kmene 1636 + pALS4K fermentujícího v GYM médiu s glukózou a iontová mapa. Pozitivní mód.

5.6 Genetická analýza kmene BCCO10 1552

Kmen BCCO10 1552 byl pro práci vybrán na základě genetického screeningu na přítomnost genu *als*. V opačném směru od *als* se nachází gen pro ligázu mastných kyselin s dlouhým řetězcem (*all*). Jeho homologem je gen *asuD3*, jenž kóduje aminolevulinát-CoA ligázu. Třetí gen z operonu pro syntézu C₅N jednotky, gen *ams* (kódující amidsyntázu) v operonu není a nenachází se ani nikde jinde v genomu (obr. 47). Tento enzym připojuje C₅N jednotku k dolnímu polyketidovému řetězci manumycinů amidovou vazbou. Z toho vyplývá, že operon pro biosyntézu C₅N jednotky není kompletní. V genomu nebyly nalezeny ani jiné geny homologní s geny pro biosyntézu manumycinů, dá se celkem jistě konstatovat, že kmen neprodukuje látky manumycinového typu. Kmen BCCO10 1552 byl úspěšně osekvenován až v průběhu práce s nadprodukčním kmenem, během analýz nadprodukčního kmene byla ještě sekvence DNA neznámá.



Obr. 47 Lokus o velikosti 48 Kbp s otevřenými čtecími rámcí (ORF) v okolí genu *als* kmene BCCO10 1552. Popis jednotlivých čtecích rámců viz tabulka x níže. **Žlutá** = ORF kódující potencionální enzymy a produkty zapojené v sekundárním metabolismu, **červená** = ORF pravděpodobně zapojené při biosyntéze manumycinů, **bílá** = neurčeno, **zelená** = excizionázy, **modrá** = ostatní ORF.

ORF	Podobnost ke genům pro:	Funkce	Nejbližší protein
1	Hypotetický protein		WP_030801198.1
2	CatB příbuzná O-acetyltransferáza	Inaktivace chloramfenikolu acetylací.	WP_148588036.1
3	Tetratrikopeptidový protein	Strukturní motiv umožňující interakci proteinů a seskupení proteinových komplexů.	WP_128502793.1
4	Ribonucleáza HI	Zapojení při replikaci DNA.	WP_127154599.1
5	AIM24 protein	Funkce u prokaryot neznámá.	WP_066937876.1
6	Chaplin	Hydrofóbní protein na povrchu buňky zapojený při vzniku vzdušeného mycelia.	WP_073766620.1

7	TonB-dependentní receptor	Specifický transport skrz vnější membránu využívající energii protonové hnací síly.	WP_153924399.1
8	Přídavná oxidoreduktáza	Oxidačně redukční reakce.	PJJ04884.1
9	Rho faktor	Terminace transkripce.	WP_128502958.1
10	Hypotetický protein		AJT69346.3
11	Hypotetický protein		WP_078885725.1
12	Hypotetický protein		EOY46403.1
13	Hypotetický protein		NP_627992.1
14	AraC transkripční regulátor	Rozpoznávání vícenásobných vazebných míst v regulovaných promotorech.	WP_128502776.1
15	Hypotetický protein		WP_158697400.1
16	Kináza uhlovodíků a pyrimidinu	Fosforylace.	WP_128502747.1
17	HAD hydrolázový protein	Štěpení vazeb mezi uhlíkem a halogenem.	WP_128502745.1
18	Hypotetický protein		WP_128502741.1
19	L,D-transpeptidáza	Účastní se transpeptidačních reakcí při biosyntéze peptidoglykanu.	WP_128505668.1
20	Protein obsahující DUF664 doménu	Neznámá funkce.	WP_033267500.1
21	Metalofosfoesteráza	Hydroláza fosfomono-, fosfodi- nebo fosfotri-esterů.	WP_128505682.1
22	Hypotetický protein		GAU70419.1
23	Sigma faktor 70	Základní sigma faktor pro exponencionální růst buňky.	WP_051733077.1
24	Gama-glutamyl-gama-aminobutyryl hydroláza	Katalýza reakce 4-(gama-glutamylamino)butanoát + H ₂ O → 4-aminobutanoát + L-glutamát. Degradace biogenních polyaminů .	WP_047014826.1
25	Protein obsahující LysM peptidoglykan-vázající doménu	Vazba peptidoglykanu.	WP_030801261.1

24	Hypotetický protein		WP_128507988.1
27	Protein obsahující CBS doménu	Regulace aktivity enzymů a transportérů vazbou ATP, ADP apod.	WP_128505697.1
28	M3 metallopeptidáza	Peptidáza využívající kov jako kofaktor. Štěpení proteinů.	WP_128505699.1
29	Ligáza mastných kyselin s dlouhým řetězcem (long-chain fatty acid--CoA ligase) / ALL	Homolog asuD3 . 66.88% podobnost na základě srovnání genové sekvence.	WP_128510941.1
als	5-aminolevulinát syntáza	Homolog asuD2 . 73.99% podobnost na základě srovnání genové sekvence.	WP_128510933.1
31	Maleylpyruvát izomeráza	Enzym, patřící do rodiny cis-izomeráz, katalyzuje např. přeměnu typu 3-maleylpyruvát → 3-fumarylpyruvát	WP_030801266.1
32	LysR transkripční regulátor	Regulace genů zapojených při virulenci, metabolismu, quorum sensingu a pohybu	WP_033267494.1
33	Dehydrogenáza krátkých uhlovodíkových řetězců (short chain dehydrogenase)	NAD- nebo NADP-dependentní oxidoreduktázy	SED80801.1
34	MFS (major facilitator superfamily) transportér	Přenos malých molekul přes buněčnou membránu na základě chemiosmotického gradientu	WP_030801273.1
35	MarR transkripční regulátor	Člen Multiple Antibiotic Resistance Regulator (MarR) skupiny transkripčních regulátorů (regulace genů souvisejících s efluxem)	WP_159472721.1
36	Hypotetický protein		WP_128505778.1
37	Hypotetický protein		WP_086717006.1
38	Fumarát reduktázová/sukcinát dehydrogenázová flavoproteinová podjednotka	Oxidace sukcinátu na fumarát za současné redukce ubichinonu na ubichinol	WP_078983399.1

39	Flavodoxin	Transfer elektronů	WP_136743223.1
40	Serine/threonine-protein fosfatáza	Defosforylace proteinů fosforylovaných na Ser a Thr zbytcích.	WP_127154561.1
41	Hypotetický protein		PIF86803.1
42	Fic protein	Modifikace proteinových substrátů sloučeninami obsahujícími fosfáty, včetně AMP a dalších nukleosidmonofosfátů.	GAU70429.1
43	Excinukleázová ABC podjednotka UvrA	Nukleotidová excizní oprava DNA	WP_077194360.1
44	Hypotetický protein		WP_084775675.1
45	M4 metalopeptidáza	Degradace proteinů a peptidů	WP_030801292.1
46	Arabinózová efluxní permeáza	Transmembránový transport	SOE09388.1
47	Cytochrom P450	Oxidačně redukční reakce	WP_033267479.1
48	Isopenicillin N syntáza	Oxidoreduktázová aktivita. Vznik isopenicillinu N – základní krok při biosyntéze penicilinů a cefalosporinů.	WP_128505740.1
49	TIGR03086 protein	Vazba kovů	GFE34897.1
50	Hypotetický protein		GFE34896.1

Tab. 9 Odhadované funkce otevřených čtecích rámců 48 kbp dlouhého lokusu kmene BCCO10 1552.

5.7 Disrupce genu *als* u kmene BCCO10 1552

Při vytváření mutantního kmene v genu *als* se postupovalo stejně jako v kapitole 5.3. Disrupce genu byla provedena pomocí inzerční kazety obsahující gen *aadA* pro rezistenci ke spektinomycinu a *oriT* místo pro konjugální přenos finálního plasmidového konstrukt do kmene BCCO10 1552. Inzerční kazeta byla spojena na levé straně (levé rameno – LR) s 1 282 bp dlouhým úsekem a zbytkem genu *als* (*hemA*) a na pravé straně (pravé rameno – PR) s 1 274 bp dlouhým úsekem a zbytkem genu *als*.

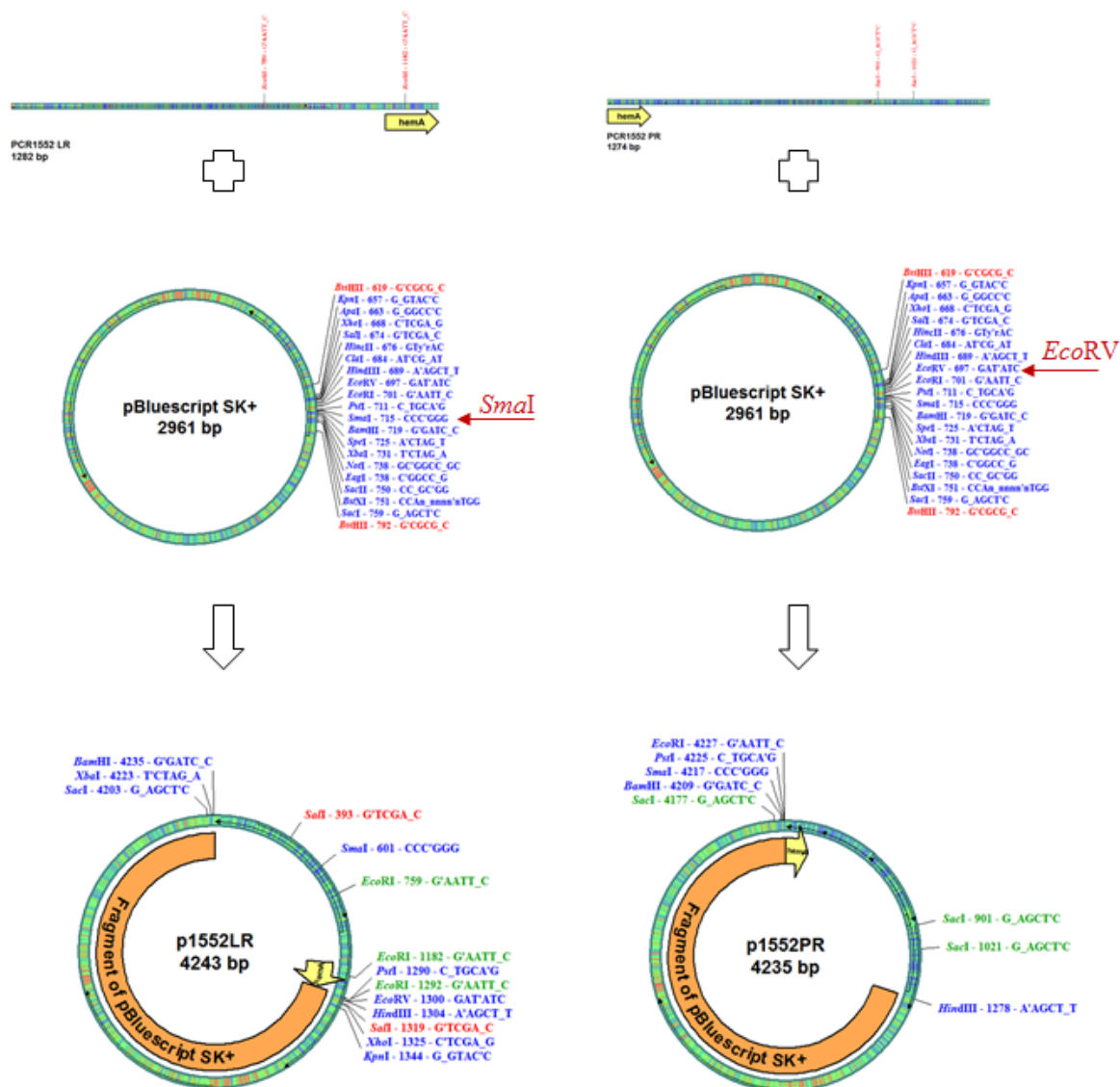
Amplifikace levého a pravého ramene pomocí PCR a jejich vložení do vektoru

Pro amplifikaci LR a PR byly navrženy následující dvě dvojice primerů (forward a reverse):

1552LR-F	TTC TGG TTG TAC GCC ACC AC	PCR amplifikace levého ramene	Očekávaná velikost: 1 282 bp
1552LR-R	CTG CAC CAG ACG CTG ATT TC		
1552PR-F	CAT CTA CGT CCA GGC CAT CA	PCR amplifikace pravého ramene	Očekávaná velikost: 1 274 bp
1552PR-R	GGT GAG CGA GAT CTC CAC CT		

Tab. 10 Primery použité pro amplifikaci LR a PR kmene BCCO10 1552

Produkty PCR byly vloženy do vektoru pBluescript SK+. Postupovalo se stejně jako v kapitole 5.2 (obr. 48).

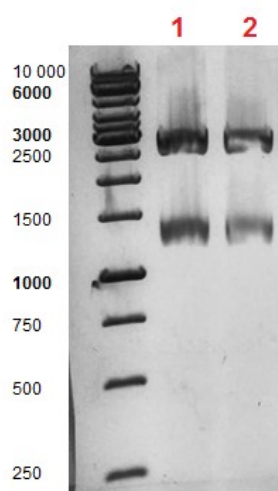


Obr. 48 Postup prvního kroku klonování – klonování natupo za využití pBluescript SK+ jako vektoru. Levé rameno (LR) bylo klonováno do místa, kde byl pBlueScript SK+ štěpen *SmaI* restrikční endonukleázou. Pravé rameno (PR) bylo klonováno do místa, kde byl pBlueScript SK+ štěpen *EcoRV* restrikční endonukleázou.

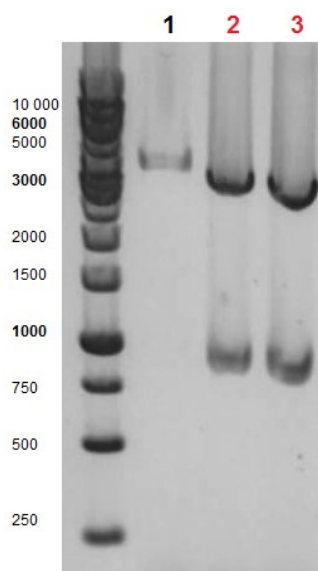
Po ukončení ligace byly konstrukty vloženy do *E. coli* SURE[®] pomocí elektroporace (viz kapitola 4.2.3) a 300 µl kultury bylo vyseto na sterilní Petriho misky obsahující LB médium s ampicilinem, IPTG a X-gal pro modro-bílou selekci. Z vybraných bílých kolonií byla izolována DNA, která byla nejprve porovnána s prázdným plasmidem pBlueScript SK+ a byla vybrána ta, která se na agarózové gelové elektroforéze jevila větší o vložený fragment. Vybrané vzorky byly podrobeny restrikční analýze pro ověření správnosti vloženého fragmentu a jeho orientace. Konstrukt o velikosti 4 243 bp obsahující LR vložené do pBlueScript SK+ nese název p11552LR

a konstrukt o velikosti 4 235 bp obsahující PR vložené do pBlueScript SK+ nese název p1552PR.

Pro restrikční analýzu p1552LR byly použity enzymy *Hind*III a *Xba*I za vzniku fragmentů o velikosti 1 324 bp a 2 919 bp (obr. 49). Pro restrikční analýzu p1552PR byl použit enzym *Sac*I za vzniku fragmentů o velikosti 120 bp, 959 bp a 3 156 bp (obr. 50).



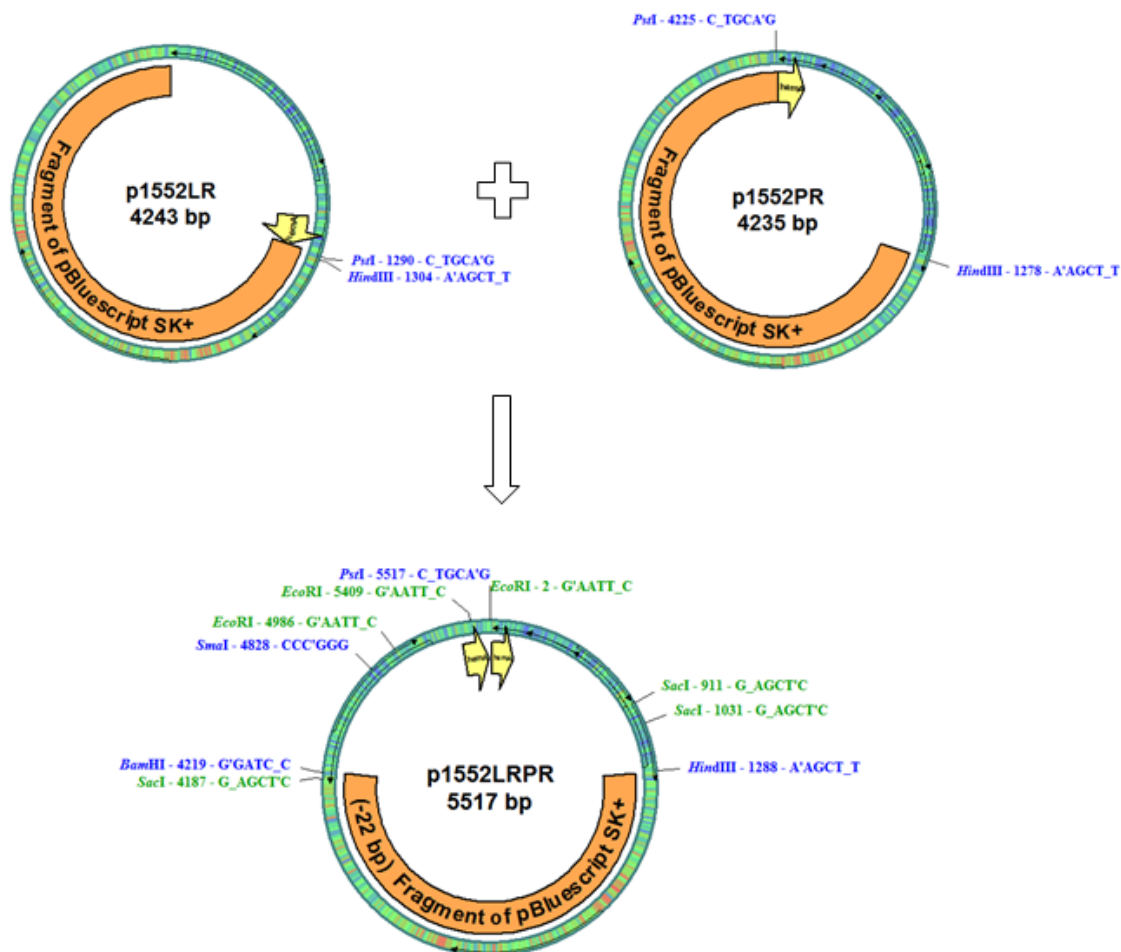
Obr. 49 Restrikční analýza konstruktů p1552LR za použití RE *Hind*III a *Xba*I za vzniku fragmentů o velikosti 1 324 bp a 2 919 bp. Pozitivní jsou oba vzorky **1** a **2**. Jako velikostní standard byl použit Thermo Scientific™ GeneRuler™, viz kapitola 4.1.8.



Obr. 50 Restrikční analýza konstruktů p1552PR za použití RE *Sac*I za vzniku fragmentů o velikosti 120 bp, 959 bp a 3 156 bp. Pozitivní jsou vzorky **2** a **3**. Jako velikostní standard byl použit Thermo Scientific™ GeneRuler™, viz kapitola 4.1.8.

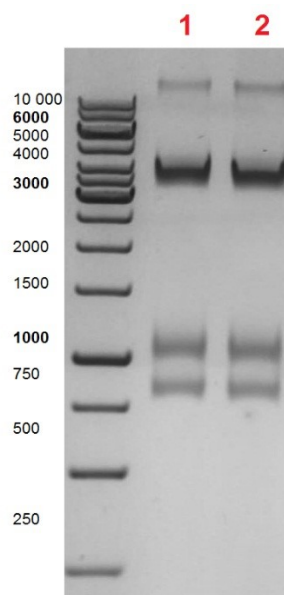
Spojení levého a pravého ramena v jeden konstrukt

Obě ramena byla k sobě v dalším kroku spojena ve správné orientaci metodami molekulárního klonování (viz kapitola 4.2.2), výsledný konstrukt o velikosti 5 517 bp byl nazván p1552LRPR (obr. 51): do p1552LR štěpeného enzymy *Pst*I a *Hind*III byl vložen fragment *Pst*I-*Hind*III z p1552PR nesoucí pravé rameno.



Obr. 51 Návrh klonovacího postupu spojení p1552LR a p1552PR ve výsledný konstrukt p1552LRPR o velikosti 5 517 bp.

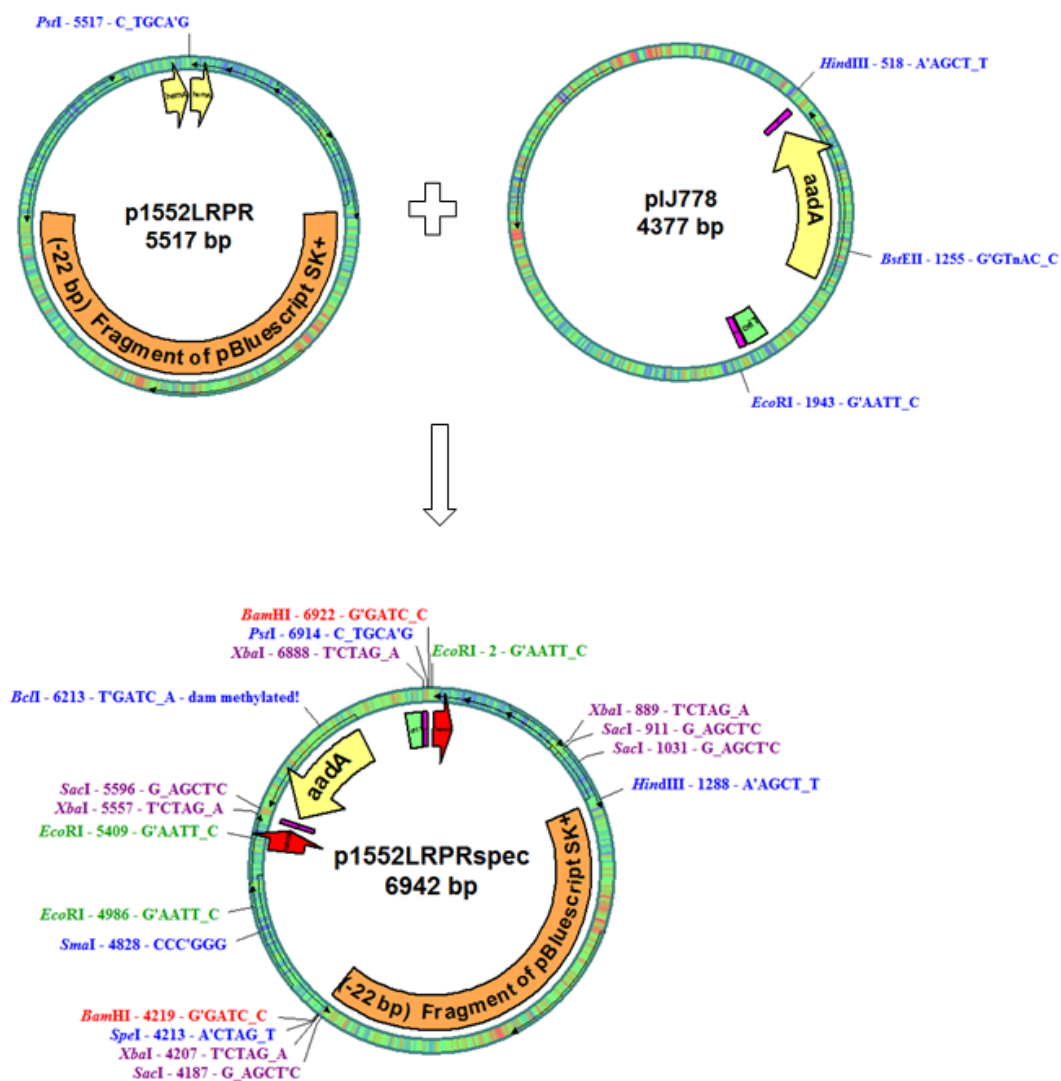
Izolovaný konstrukt byl opět podroben restriční analýze pro zjištění přítomnosti fragmentu LR a jeho správné orientace. Štěpení probíhalo enzymem *Not*I a očekávány byly fragmenty o velikosti 846 bp, 1 052 bp a 3 619 bp (obr. 52).



Obr. 52 Restrikční analýza konstruktu p1552LRPR o velikosti 5 517 bp. Konstrukt byl štěpen enzymem *NotI* za vzniku fragmentů o velikosti 846 bp, 1 052 bp a 3 619 bp. Jako velikostní standard byl použit Thermo Scientific™ GeneRuler™, viz kapitola 4.1.8.

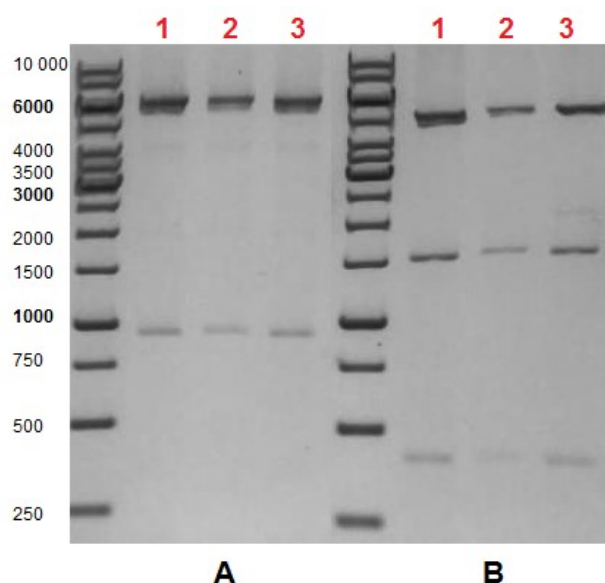
Vložení rezistenční kazety mezi levé a pravé rameno konstruktů

V další fázi klonování bylo potřeba vložit mezi LR a PR inzerční kazetu obsahující gen *aadA* pro rezistenci ke spektomycinu a *oriT* umožňující konjugální přenos konstruktů mezi *E. coli* SURE® a kmenem BCCO10 1552 (obr. 53). Tato rezistenční kazeta pocházela z plasmidu pIJ778 a byla vyštěpena restrikčními endonukleázami *EcoRI* a *HindIII*. Konstrukt p1552LRPR byl štěpen RE *PstI*. Postup byl stejný jako v kapitole 6.2.3.



Obr. 53 Návrh klonovacího postupu pro p1552LRPR jako vektoru a pIJ778 jako donoru fragmentu obsahující gen *aadA* a *oriT*. Výsledný fragment p1552LRPRspec měl velikost 6 942 bp.

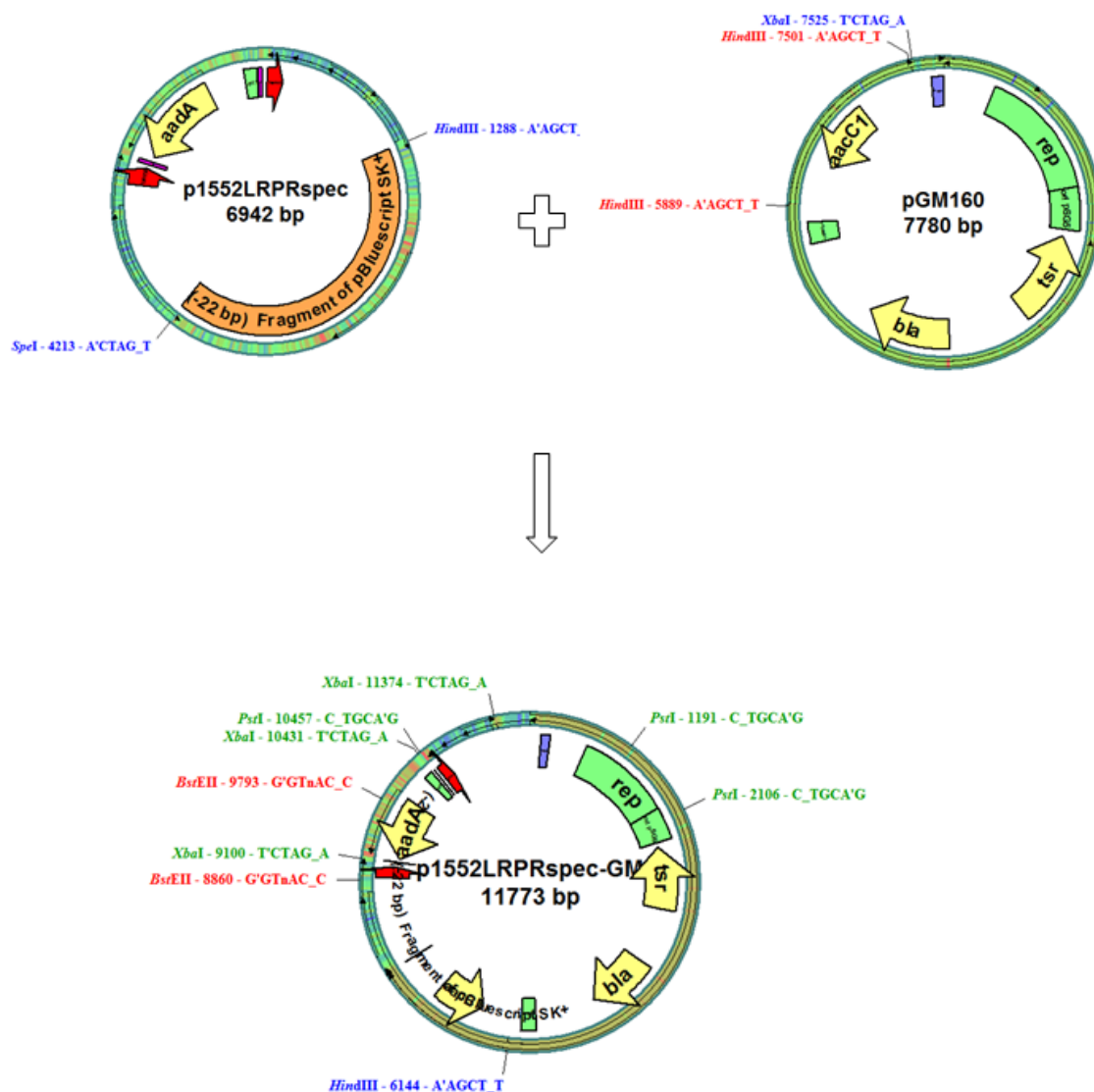
Restrikční analýza pro ověření přítomnosti rezistenční kazety a její orientace ve vzniklém fragmentu byla provedena ve dvou štěpeních – jednou byl konstrukt štěpen pomocí RE *BstEII* (s očekávanými fragmenty 933 bp a 6009 bp; obr. 54 A) a poté byl konstrukt štěpen RE *EcoRI* (s očekávanými fragmenty 423 bp, 1 535 bp a 4 984 bp; obr. 53 B).



Obr. 54 (A) Restrikční analýza konstruktů p1552LRPRspec pomocí RE *BstEII*. Vzniklé fragmenty mají velikost 933 bp a 6009 bp. (B) Restrikční analýza konstruktů p1552LRPRspec pomocí RE *EcoRI*. Vzniklé fragmenty mají velikost 423 bp, 1 535 bp a 4 984 bp. Jako velikostní standard byl použit Thermo Scientific™ GeneRuler™, viz kapitola 4.1.8.

Vytvoření finálního konstruktů určeného pro transformaci do kmene BCCO10 1552

Kompletní inserční kazeta byla vložena do vektoru pGM160. (viz kapitola 4.1.2). Konstrukt p1552LRPRspec byl štěpen RE *HindIII* a *SpeI* a byl vložen do vektoru pGM160 štěpeného RE *HindIII* a *XbaI* (obr. 55). Očekáván byl finální konstrukt s názvem p1552LRPRspec-GM o velikosti 11 773 bp. Postup byl stejný jako v kapitole 5.2.4.

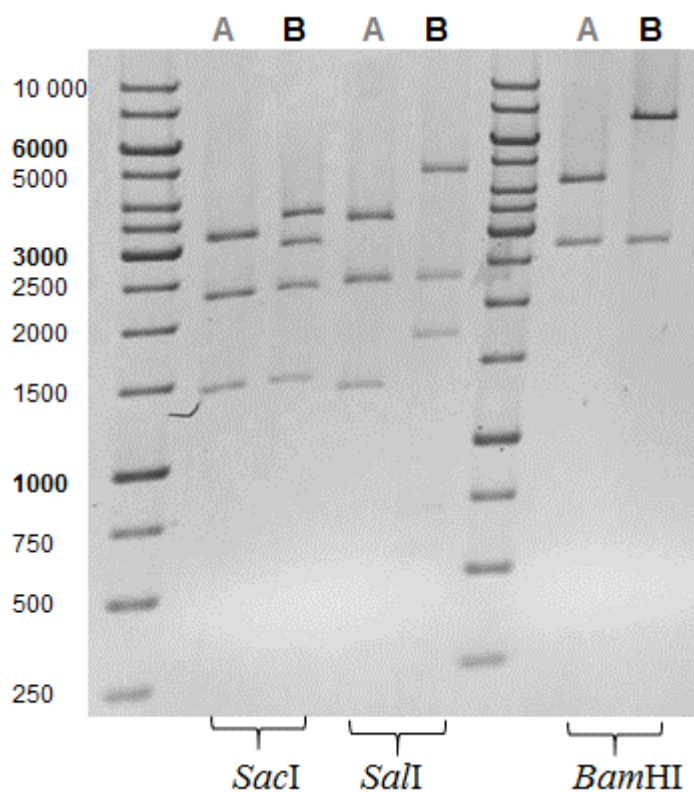


Obr. 55 Návrh klonovacího postupu pro p1552LRPRspec a pGM160 za vzniku finálního konstruktu o velikosti 11 773 bp nesoucí název p1552LRPRspec-GM. Fragment z konstruktu p1552LRPRspec byl stejně jako v případě p1636LRspecPR-GM vložen do *HindIII* místa blíže k *XbaI*.

Restrikční analýza (obr. 56) probíhala jak u p1552LRPRspec, tak u finálního konstruktu p1552LRPRspec-GM pro lepší porovnání, jelikož u vektoru pGM160 neznáme jeho kompletní DNA sekvenci, a nejsou tak známa všechna restrikční místa. Oba plasmidy byly podrobeny štěpení RE *Bam*HI, *Sac*I, a *Sal*I s předpokládanou tvorbou následujících fragmentů (tab. 11):

	<i>SacI</i>	<i>SalI</i>	<i>BamHI</i>
P1552LRPRspec A	120 bp 2 257 bp 1 409 bp 3 156 bp	1 329 bp 2 296 bp 3 317 bp	2 703 bp 4 239 bp
P1552LRPRspec-GM B	120 bp 282 bp 2 257 bp 3 478 bp 4 024 bp	2 2296 bp 7 865 bp	1 314 bp 2 703 bp 6 144 bp

Tab. 11 Předpokládané velikosti fragmentů u p1552LRPRspec a p1552LRPRspec-GM po restrikční analýze. A a B značí vzorek na obrázku 55.

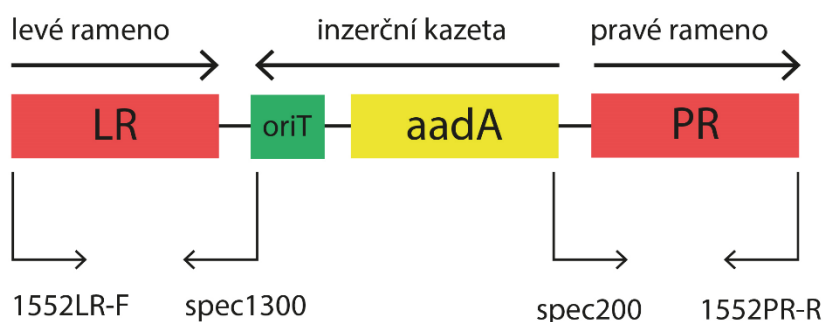


Obr. 56 Restrikční analýza p1552LRPRspec (A) a p1552LRPRspec-GM (B). Jako velikostní standard byl použit Thermo Scientific™ GeneRuler™, viz kapitola 4.1.8.

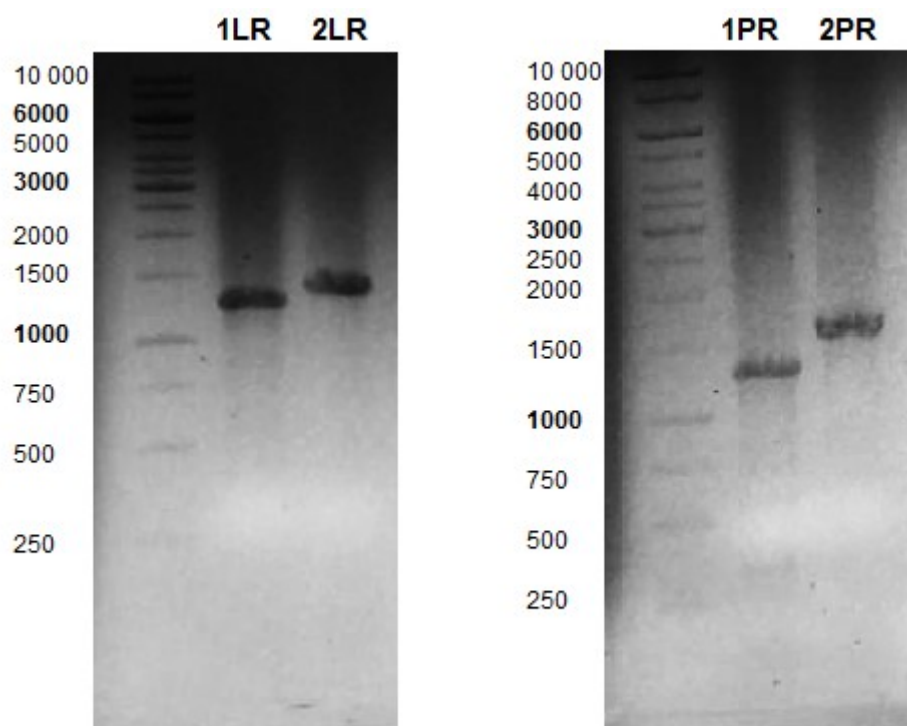
Přenos finálního konstrukt p1552LRPRspec-GM do kmene BCCO10 1552

Prvním krokem byla transformace elektrokompetentního kmene *E. coli* ET12567/pUZ8002 konstruktem p1552LRPRspec-GM pomocí elektroporace. Poté proběhla konjugace mezi *E. coli* ET12567/pUZ8002 nesoucí konstrukt p1552LRPRspec-GM a divokým typem kmene BCCO10 1552. Postup byl stejný jako v kapitole 5.2.5.

Po konjugaci byla z kolonií kmene BCCO10 1552 vybrána jedna, ze které byla izolována chromozomální DNA pomocí komerčního kitu Wizard Genomic DNA Purification Kit. Pro ověření přítomnosti plasmidu byla provedena PCR reakce se dvěma kombinacemi primerů: 1552LR-F + spec1300 a 1552PR-R + spec200. Strategie ověření delečního kmene byla stejná jako v kapitole 5.2 (obr. 57). Po proběhnuté PCR reakci byly produkty PCR nanесeny na gelovou elektroforézu. Pro srovnání byly nanесeny do vedlejší jamky amplifikované levé a pravé rameno. Produkt s primery 1552LR-F + spec1300 a s primery 1552PR-R + spec200 by měl být přibližně o 200 bp větší než produkt 1552LR-F + 1552LR-R (levé rameno) a než produkt 1552PR-F + 1552PR-R (pravé rameno). Výsledek vyhodnocení elektroforézy je na obr. 58.



Obr. 57 Schéma nasedání primerů 1552LR-F (forward) + spec1300 (reverse) a spec200 (forward) + 1552PR-R (reverse). Šipky nahoře ukazují orientaci ramen a inzerční kazety.



Obr. 58 Produkty PCR. Na obrázku vlevo LR1 je produktem za použití primerů 1552LR-F a 1552LR-R čili amplifikované levé rameno kmene BCCO10 1552 o velikosti 1 282 bp. LR2 je produkt PCR s použitím primerů 1552LR-F a spec1300 o velikosti 1 379 bp. Vpravo 1PR je PRC produktem za použití primerů 1552PR-F a 1552PR-R čili amplifikované pravé rameno o velikosti 1 274 bp. PR2 je produkt PCR s použitím primerů spec200 a 1552PR-R o velikosti 1 485 bp. Jako velikostní standard byl použit Thermo Scientific™ GeneRuler™, viz kapitola 4.1.8.

Integrace inzerční kazety do chromozomu kmene BCCO10 1552 a disrupce genu *als* v chromozomu

Tento krok vedl k vytvoření delečního mutantu kmene BCCO10 1552 s pracovním označením 1552 Δ *als*. Postup byl stejný jako v kapitole 5.3.

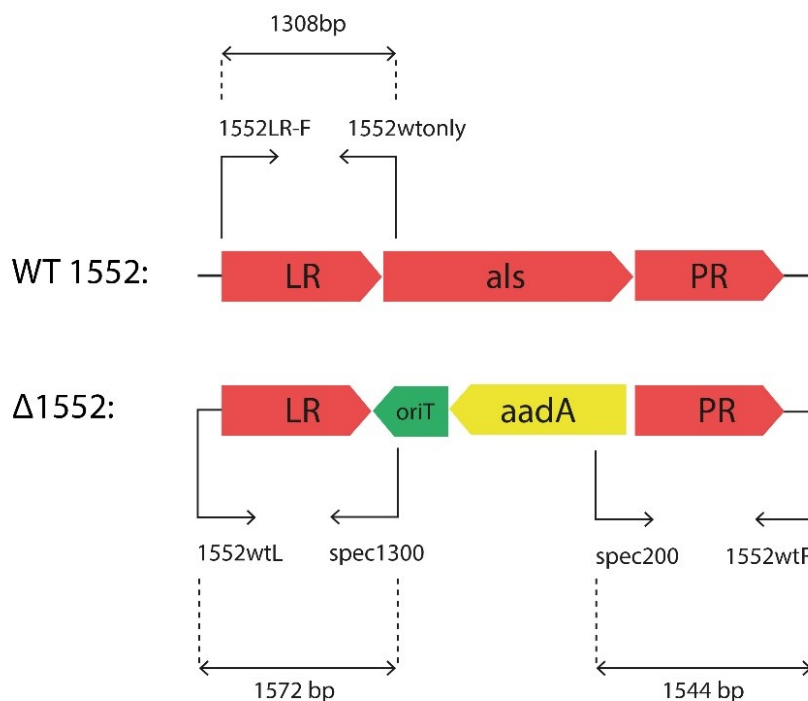
Z jedné kolonie vyrostlé na Petriho misce obsahující MS médium se spektinomycinem byla izolována chromozomální DNA pomocí komerčního kitu Wizard Genomic DNA Purification Kit. Následovaly tři PCR, kdy templátem byla izolovaná chromozomální DNA z Δ 1552 a DNA izolovaná z divokého typu (WT) kmene BCCO10 1552. PCR probíhaly následně s těmito kombinacemi primerů (tab. 12):

Reakce	Použité primery	Velikost produktu u 1552Δ <i>als</i>	Velikost produktu u 1552 WT
1.	1552LR-F + 1552wtonly	-	1 308 bp
2.	1552wtL + spec1300	1 572 bp	-
3.	1552wtR + spec200	1 544 bp	-

Tab. 12 Rozpis tří PCR s kombinacemi primerů a očekávanými velikostmi produktů.

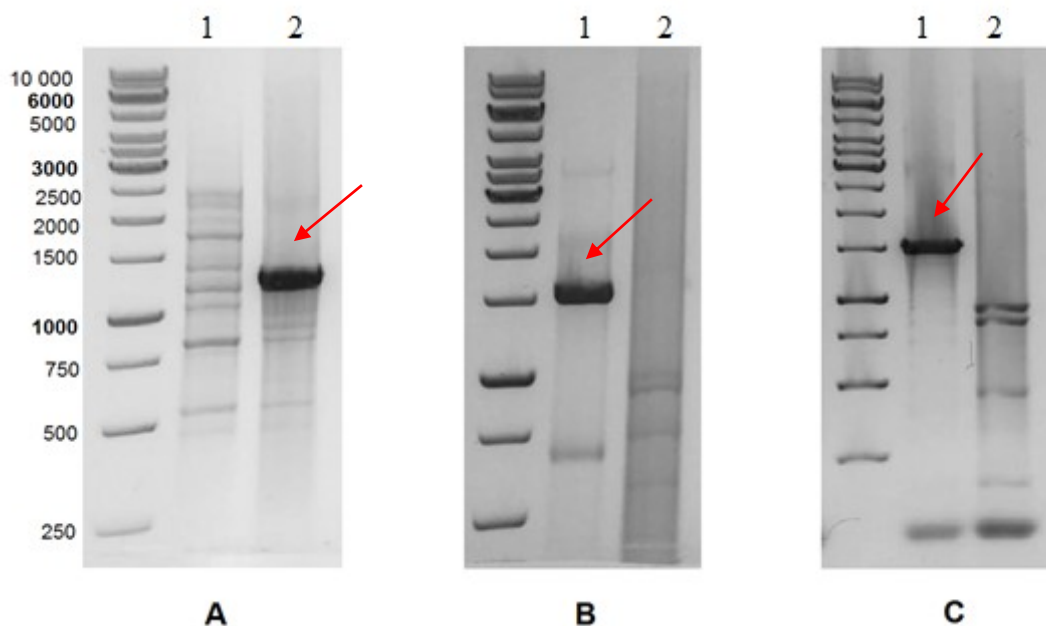
V případě první reakce byly primery navrženy tak, aby nasedaly pouze na DNA divokého typu obsahující *als* gen. Bylo potřeba ověřit, že produkt vzniká pouze u WT 1552 a ne u 1552Δ*als*, což by znamenalo, že delece genu *als* nebyla úspěšná.

V případě druhé a třetí reakce byly primery navrženy tak, aby nasedaly dále v chromozomu za levým i pravým ramenem divokého kmene i delečního, zato primery spec200 a spec1300 jsou specifické pouze pro inzerční kazetu. V tomto případě DNA WT 1552 sloužila jako negativní kontrola. U 1552Δ*als* se naopak potvrdila přítomnost zaintegrované inzerční kazety přímo v chromozomu (obr. 59).



Obr. 59 Schéma nasedání primerů na DNA divokého kmene a na DNA mutantního kmene BCCO10 1552.

Produkty PCR byly nanесeny na agarózovou gelovou elektroforézu (obr. 60).



Obr. 60 Analýza PCR na agarózové gelové elektroforéze. 1 = 1552 Δ als; 2 = WT 1552. (A) Jedná se o 1. reakci za použití primerů 1552LR-F + 1552wtonly. Produkt je pouze u WT 1552 o velikosti 1 308 bp, to znamená, že u delečního mutanta není příměs divokého typu bez integrované inzerční kazety. (B) 2. reakce za použití primerů 1552wtL + spec1300. WT slouží jako negativní kontrola, u 1552 Δ als je přítomnost inzerční kazety v chromozomu potvrzena produktem o velikosti 1 572 bp. (C) 3. reakce za použití primeru 1552wtR + spec200. WT slouží jako negativní kontrola, u 1552 Δ als je přítomnost inzerční kazety v chromozomu potvrzena produktem o velikosti 1 544 bp. Jako velikostní standard byl použit Thermo Scientific™ GeneRuler™, viz kapitola 4.1.8.

5.8 Příprava nadprodukčního kmene BCCO10 1552

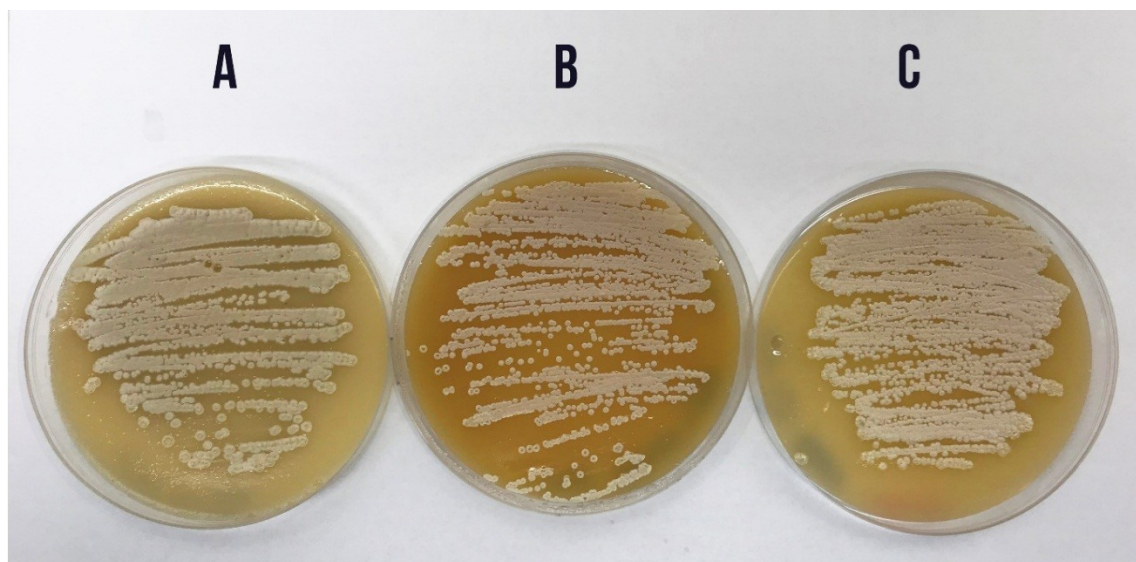
Nadprodukční kmen byl připraven za použití plasmidu pALS4K, který s dovolením poskytl Mgr. Kateřina Petříčková, Ph.D. Postup byl stejný jako v kapitole 5.4.

5.9 Analýza extraktů sekundárních metabolitů kmene BCCO10 1552

Analýza extraktů sekundárních metabolitů kmene BCCO10 1552 probíhala pomocí TLC, biologického testu a pomocí LC-MS. LC-MS analýza byla provedena panem Ing. Davidem Kahounem, Ph.D. při Jihočeské univerzitě v Českých Budějovicích. Postup extrakce a všech analýz je popsán v kapitole 4.2.4.

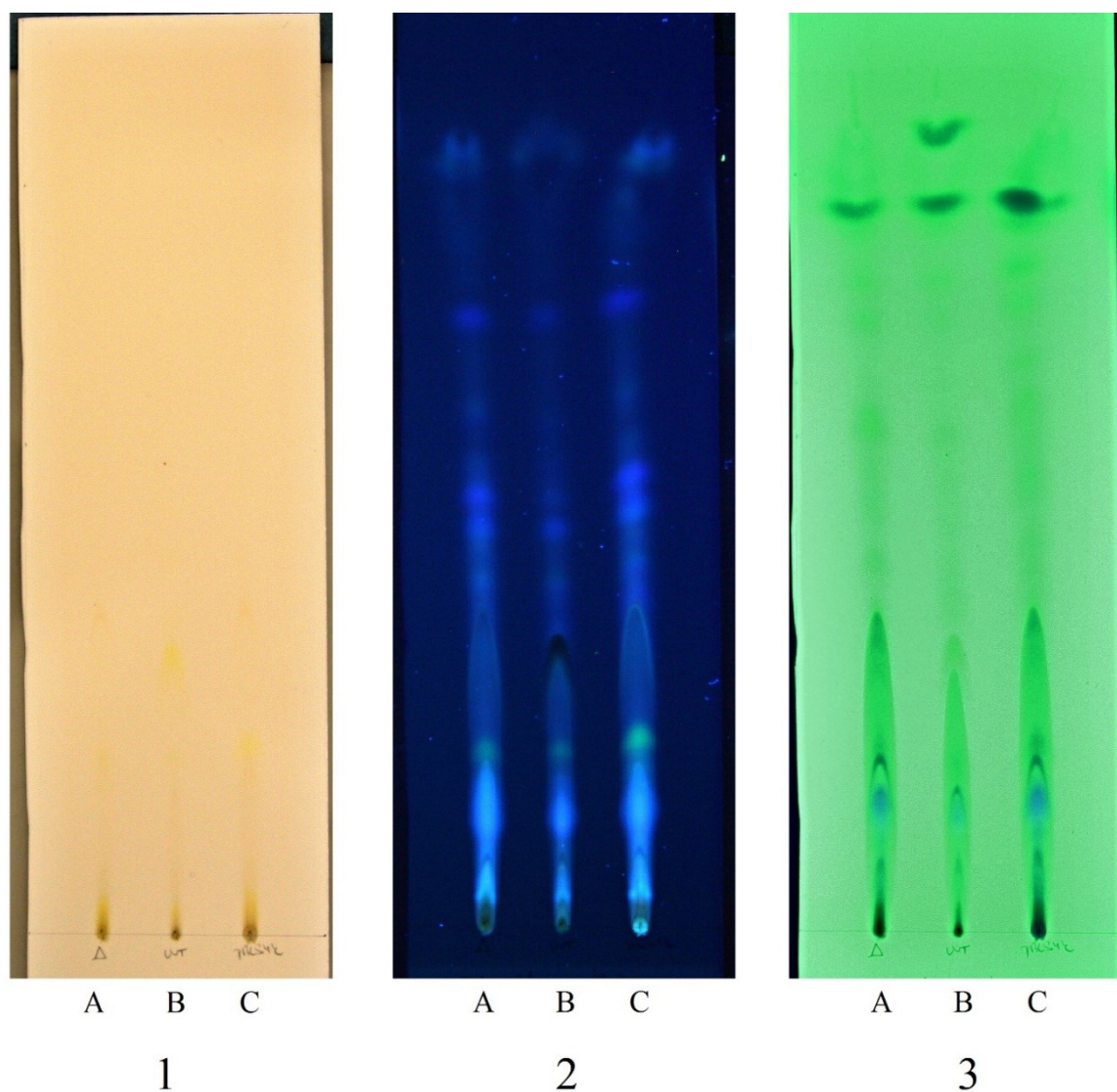
Pro TLC analýzu bylo potřeba zhotovit extrakty sekundárních metabolitů z divokého typu kmene BCCO10 1552 (WT 1552), z nadprodukčního kmene BCCO10

1552 obsahující plasmid pALS4K (1552 + pALS4K) a z delečního kmene BCCO10 1552 (1552 Δ als) (obr. 61). Kmeny byly pro extrakci kultivovány v GYM médiu, kde byla jako zdroj cukrů použita **glukóza**. Po kultivaci v médiu s glycerolem nebyla u tohoto kmene na biologickém testu pozorována žádná antibiotická aktivita, proto kultivace a fermentace probíhala jen v GYM médiu s glukózou.



Obr. 61 (A) Divoký typ kmene BCCO10 1552 na MS médiu. (B) Nadprodukční kmen BCCO10 1552 obsahující plasmid pALS4K na MS médiu s apramycinem. (C) Deleční kmen BCCO10 1552 s deletovaným genem *als* místo něhož obsahuje inzerční kazetu s rezistencí na spektinomycin. MS médium se spektinomycinem.

Sekundárních metabolity kmene BCCO10 1552, fermentujícího v GYM médiu obsahující glukózu, byly extrahovány nepolárními rozpouštědly (aceton, ethylacetát) a rozpuštěny v chloroformu. Na TLC desku byly extrakty nanесeny v přibližném objemu 5 μ l jako je popsáno v kapitole 4.2.4 ve dvou provedeních. Jedna TLC deska byla použita pro detekci sekundárních metabolitů ozářením dlouhovlnným a krátkovlnným UV světlem (obr. 62), druhá TLC deska byla použita pro biologický test (obr. 63).



Obr. 62 TLC analýza extraktů BCCO10 1552 fermentujícího v GYM médiu obsahujícího glukózu. A = deleční kmen 1552 Δ als, B = divoký typ, C = nadprodukční kmen. (1) Fotografie na denním světle. (2) Fotografie TLC desky ozářené UV světlem o vlnové délce 366 nm. (3) Fotografie TLC desky ozářené UV světlem o vlnové délce 254 nm.

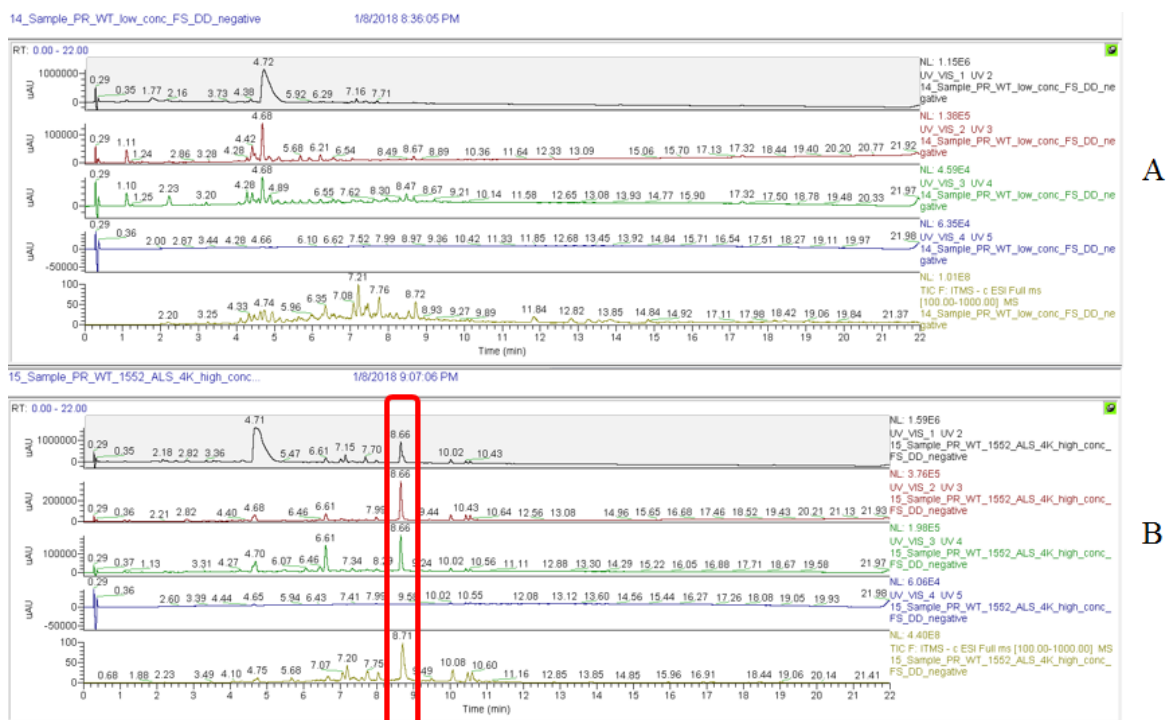


Obr. 63 Biologický test extraktů kmene BCCO10 1552 fermentujícího v GYM médiu obsahujícím glukózu. A = deleční kmen 1552 Δ *als*, B = divoký typ, C = nadprodukční kmen.

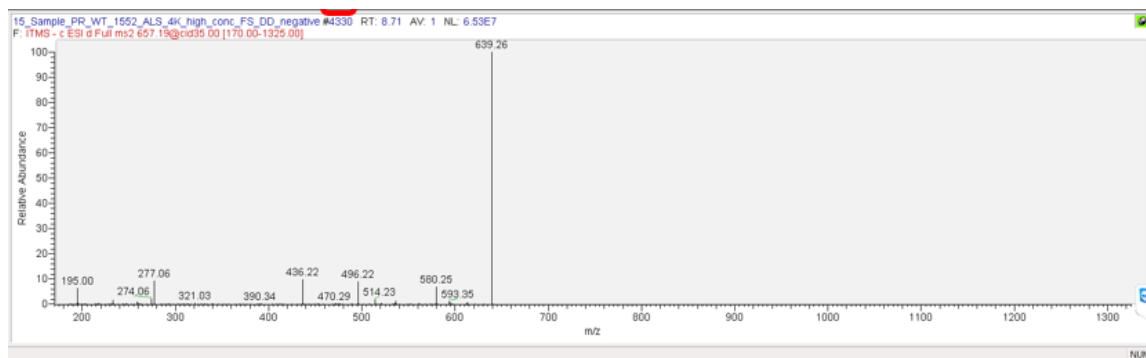
V průběhu příprav delečního kmene 1552 Δ *als* byla provedena LC-MS analýza vzorků extraktů sekundárních metabolitů divokého kmene 1552 a nadprodukčního kmene obsahujícího pALS4K.

Na LC-MS spektru bylo zjišťováno, zda je v porovnání se vzorkem 1552 WT ve vzorku 1552 + pALS4K (nadprodukční kmen) nová sloučenina výrazně absorbující v UV oblasti a pokud ano, tak jaká je její molekulová hmotnost a hmotnostní spektrum. Ve vzorku 1552 + pALS4K byl nalezen nový pík vykazující výraznou absorbanci v UV oblasti, a to v retenčním čase **8,66 min** (obr. 64). V analýze s negativní ionizací bylo zjištěno, že v tomto píku koeluují 2 sloučeniny (639,26 g/mol a 657,21 g/mol), přičemž za odezvu v UV oblasti by měla být zodpovědná pouze sloučenina 657,21 g/mol (obr. 65). V analýze s pozitivní ionizací bylo zjištěno, že v píku koeluuje i další sloučenina

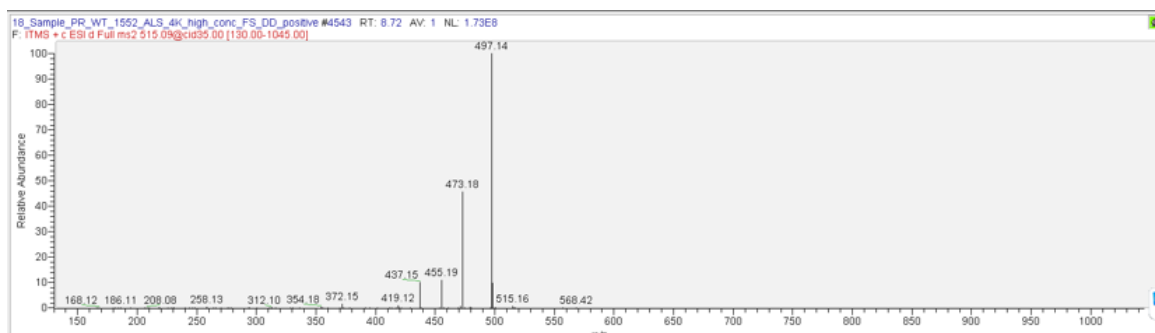
(515,09 g/mol) (obr. 66). Ze současných dat však nelze určit, která z těchto sloučenin vykazuje jakou absorpenci – tzn., v jaké míře tyto sloučeniny přispívají k celkovému signálu absorpance.



Obr. 64 LC-MS analýza kmene BCCO10 1552 v negativním módu. A = LC-MS spektrum kmene WT 1552, (B) = 1552 + pALS4K. U nadprodukčního kmene můžeme pozorovat pík v oblasti 8,66 min.



Obr. 65 MS/MS spektrum sloučeniny 657,21 v novém silně absorbujícím píku (8,66 min) v negativním módu. Za absorpci v UV oblasti je zodpovědná pouze sloučenina 657,21. Tato sloučenina poskytuje výrazný fragment (639,26), který má stejnou hmotu, jako sloučenina koeluující v daném píku (639,23). Ztráta v tomto případě činí 18, což je voda. Další ztráty jsou 77, 161, 221, 311, 380 a 462.

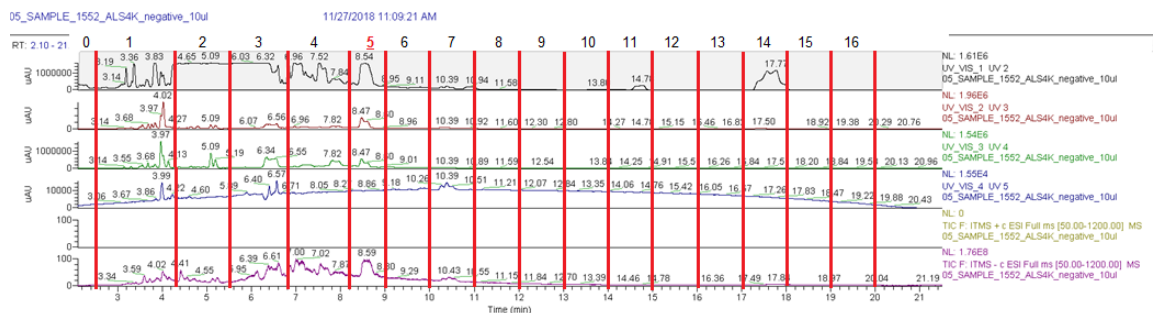


Obr. 66 MS/MS spektrum sloučeniny 515,09 v novém silně absorbujícím píku (8,66 min) v pozitivním módu. Tato sloučenina poskytuje výrazný fragment (497). Ztráta v tomto případě činí 18, což je voda. Další ztráty jsou 42, 60 a 78.

Na základě těchto dat byla provedena frakcionace vzorku 1552 + pALS4K. Před samotnou frakcionací byl vzorek ještě jednou změřen na LC-MS (obr. 67) a poté byla provedena frakcionace vzorku v těchto retenčních intervalech:

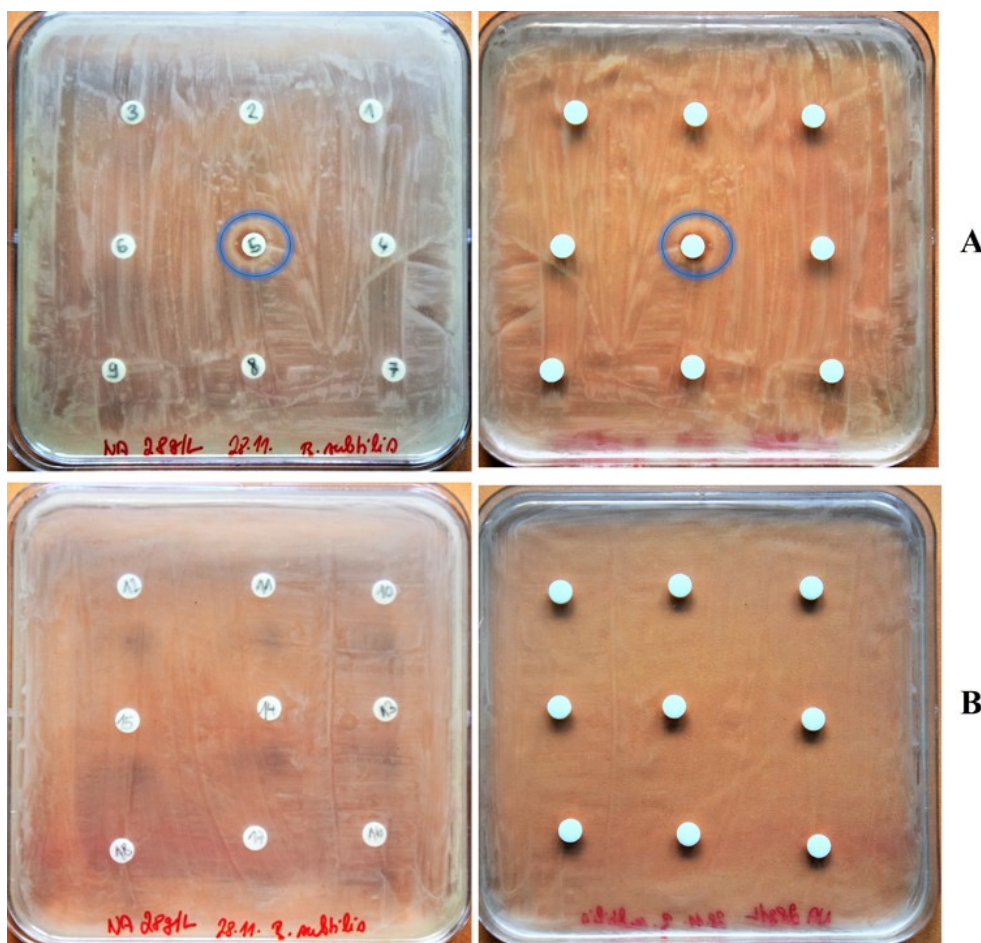
Číslo frakce	Časový interval	Číslo frakce	Časový interval
0	0-2,5 min	9	12-13 min
1	2,5-4,3 min	10	13-14 min
2	4,3-5,5 min	11	14-15 min
3	5,5-6,8 min	12	15-16 min
4	6,8-8,2 min	13	16-17 min
5	8,2-9,0 min	14	17-18 min
6	9-10 min	15	18-19 min
7	10-11 min	16	19-20 min
8	11-12 min		

Tab. 13 Postup frakcionace vzorku. Červeně je označeno číslo frakce č. 5, kde se v retenčním čase 8,2 – 9,0 min nacházel i pík z **8,66** minuty, který projevoval silnou UV absorpci a mohl by být zodpovědný za antibiotickou aktivitu kmene 1552 + pALS4K.



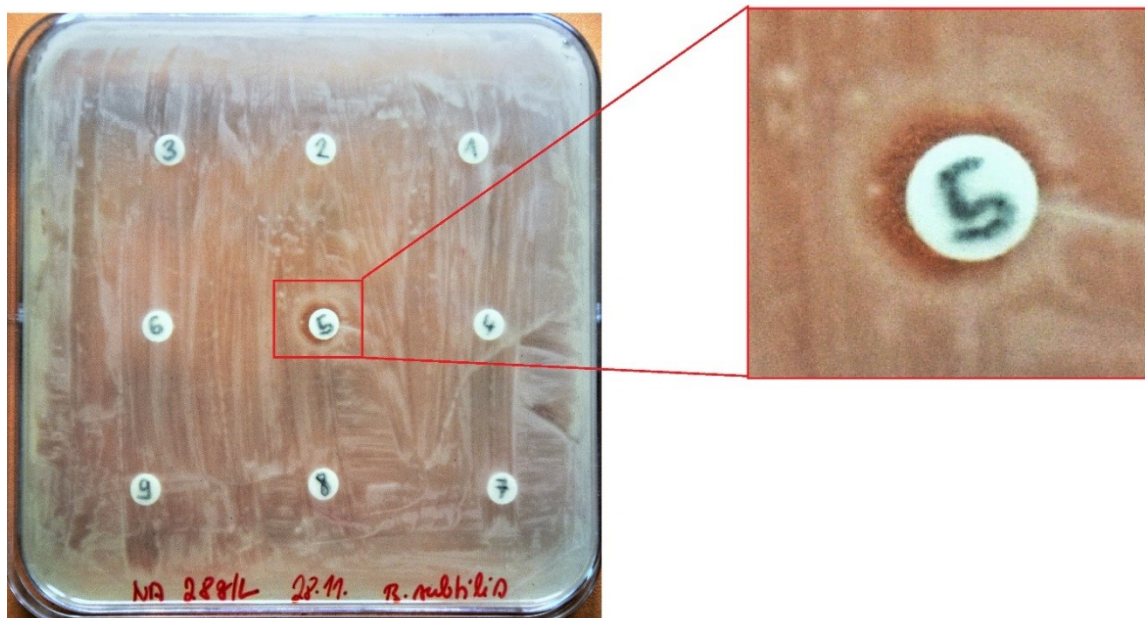
Obr. 67 LC-MS spektrum vzorku 1552+pALS4K s vyznačenými intervaly odebíraných frakcí. Červeně je označeno číslo frakce zájmu – 5. Pík v 8,66 minutě již není tak výrazný díky stárší vzorku.

Frakcionace vzorku byla provedena ve 3 opakováních pro silnější koncentraci látky ve vzorku. Každá frakce byla poté přes noc vysušena na rotačním vakuovém koncentrátoru při teplotě 37 °C. Vzorky byly poté rozpuštěny v 10 µl chloroformu a nanесeny na antibiotické disky. Ty byly poté přiloženy na čtvercové Petriho misky obsahující NA médium a kličkou rozetřený senzitivní kmen *Bacillus subtilis* (obr. 68, 69). Misky byly kultivovány přes noc.



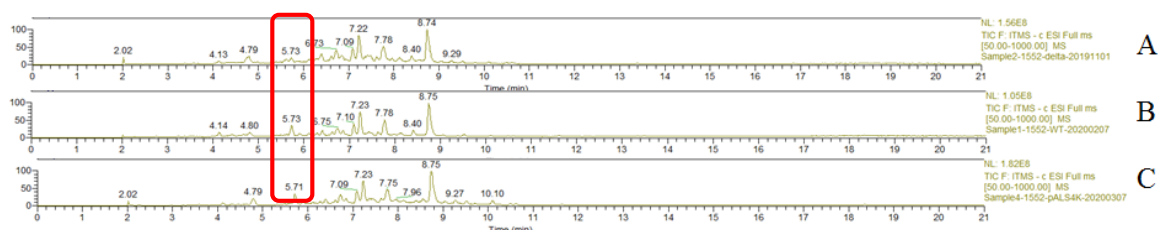
Popis obrázku na další straně

Obr. 68 Biologický test pomocí antibiotických disků. A = Petriho miska s disky obsahujícími frakce 1-9, B = Petriho miska s disky obsahujícími frakce 10-18. Kolem disku obsahujícím frakci č. 5 (modrý kruh) lze pozorovat inhibiční zónu.



Obr. 69 Přiblížení: inhibiční zóna kolem antibiotického disku obsahujícího frakci č. 5.

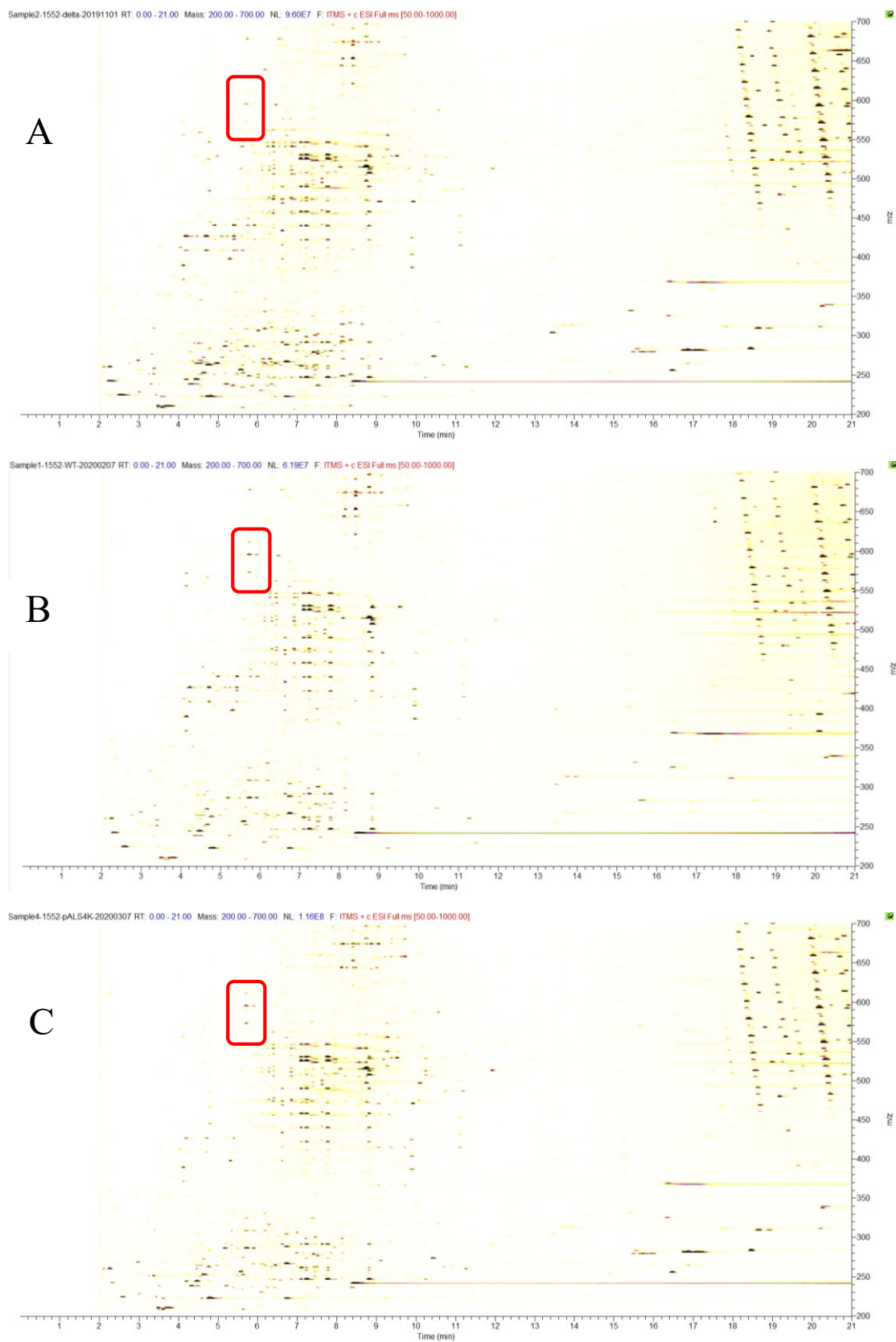
Po získání mutantního kmene 1552 Δ als byla znovu provedena LC-MS analýza, která potvrdila výsledky, které jsme získali. Mezi LC-MS spektry vzorků 1552 WT, 1552 Δ als a 1552 + pALS4K nebyly objeveny žádné výrazné rozdíly (obr. 70). Nicméně v 5,73 minutě pozorujeme pík, který je výraznější u WT a u nadprodukčního kmene, naopak u delečního kmene je pík slabší.



Obr. 70 Full scan MS záznamy absorbance v celé UV i VIS oblasti. A = spektrum delečního kmene 1552 Δ als, B = WT 1552, C = 1552 + pALS4K.

Malé rozdíly byly nalezeny i v iontových mapách (full scan MS) všech tří vzorků (obr. 71) pravděpodobně korelující právě s píkem v 5,73 minutě. Byly hledány ionty,

které se u nadprodukčního kmene vyskytují ve větší míře, zato u delečního kmene nejsou přítomny.



Popis obrázku na další straně

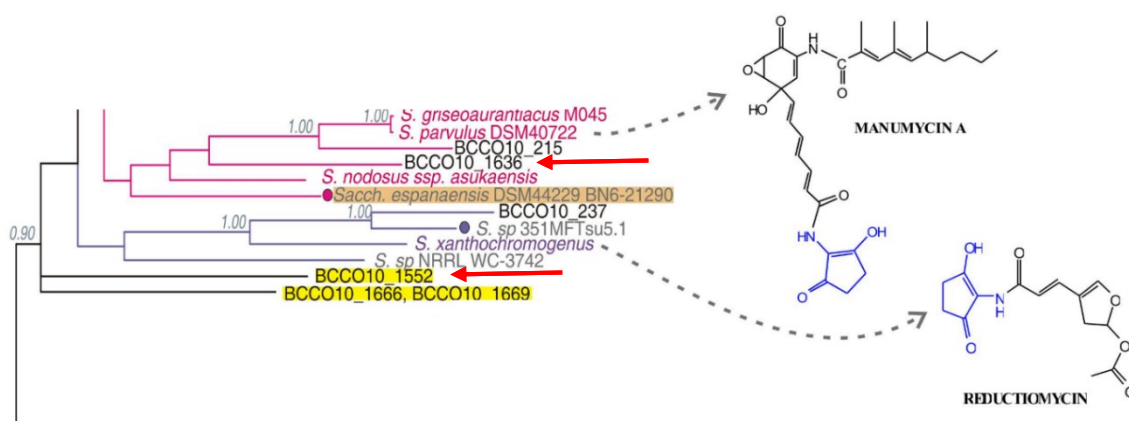
Obr. 71 Záznam scanů produktových iontů (full scan MS), pozitivní mód. A = iontová mapa vzorku extraktu pocházejícího z kmene BCCO10 1552, deleční kmen (1552 Δ als), B = divoký typ, C = nadprodukční kmen nesoucí plasmid pALS4K.

6 Diskuse

Dostupnost nových bioaktivních látek s účinnými vlastnostmi je v dnešní době velmi žádaná. Nejen medicína se potýká s novými kmeny bakterií či plísní vykazujících rezistenci vůči celé škále antibiotik. Pro moderní medicínu jsou neméně atraktivní též další typy biologicky aktivních, nízkomolekulárních látek, jako jsou kancerostatika, imunosupresiva, inhibitory enzymů atd. Kromě chemické syntézy nových léků se nabízí možnost prozkoumat - díky modernějším metodám - také přírodní rezervoár v podobě mikroorganismů. Výhodou je také současná dostupnost genomických dat ve veřejných databázích, jejichž porozuměním a uvedením do souvislosti s produkcí sekundárních metabolitů jsme schopni objevovat nové přírodní sloučeniny. V mikrobiální oblasti toho bylo poprvé systematicky aplikováno při analýze kompletního genomu *Streptomyces coelicolor* A3(2) a *Streptomyces avermitilis* (Challis 2008).

Streptomycety jsou známy pro svou schopnost produkovat bioaktivní látky, především antibiotika (Běhal 2000). Manumyciny jsou jedněmi z nich. Po objevení manumycinu A v roce 1963 se manumyciny staly objektem zájmu mnoha vědeckých studií pro jejich početné bioaktivní vlastnosti, jako například protinádorové, antibiotické nebo imunosupresivní účinky (Thiericke *et al.* 1990). Manumyciny byly rovněž předmětem zájmu předchozího projektu skupiny Mgr. Kateřiny Petříčkové, Ph.D. a Ing. Miroslava Petříčka, CSc. Na základě dat získaných v předchozím projektu týkajícího se biosyntézy manumycinů byl identifikován unikátní enzym cyklizující 5-aminolevulinát syntáza (cALAS), zapojený přímo při biosyntéze manumycinů obsahujících C₅N jednotku. V rámci současného projektu **Unikátní biosyntetické enzymy jako klíč k novým bioaktivním látkám (17-30091A, AZV MZČR)** hledáme producenty látek s antibiotickými nebo imunomodulačními účinky na základě genetického přístupu zaměřeného na unikátní biosyntetické enzymy. V případě této práce se jedná právě o enzym cALAS. Tento enzym je specifický pro tvorbu C₅N jednotky, která je součástí mnoha bioaktivních sekundárních metabolitů jako například manumycin A, reductionmycin, annimycin atd. (Petříček *et al.* 2006). cALAS je kódována genem *als*, homologem genu *hemA*. Ten byl použit jako genetická značka při identifikaci producentů látek obsahujících C₅N jednotku (Petříčková *et al.* 2015). Vybrané izoláty streptomycet pozitivní na přítomnost homologu genu *hemA* jsou objektem zájmu této práce.

Pro práci byly vybrány dva kmeny – kmen BCCO10 1636 a BCCO10 1552. Na výřezu (obr. 71) z obrázku č. 13 (kapitola 3.3.1.3) můžeme vidět fylogenetický strom sestaven na základě uspořádání nukleotidových sekvencí PCR fragmentů *hemA* genu a polohu obou kmenů v rámci stromu. Fylogenetická příbuznost *hemA* genů přitom reflektuje charakter metabolitu, jehož biosyntézy se produkt genu účastní (Petříčková *et al.* 2015).



Obr. 72 Výřez z obrázku 13 (kapitola 3.3.1.3). Fylogenetický strom sestaven Petříčkovou *et al.* na základě porovnání nukleotidových sekvencí pro gen *als*. Růžově označená větev zahrnuje producenty lineárních polyketidů, například *S. parvulus* DSM40722 jako producenta manumycinu A a manumycinu B. Kmen BCCO10_215 produkuje rovněž tyto dva druhy manumycinů, jen v jiném poměr oproti *S. parvulus*. V této větvi se rovněž nachází i kmen BCCO10 1636. Fialově označená větev zahrnuje producenty reduciomycinu jako je například *S. xanthochromogenus*. Žlutě označené izoláty stojí ve fylogenetickém stromě samostatně a není zatím známa molekula, kterou produkují (upraveno podle Petříčková *et al.* 2015).

Kmen BCCO10 1636 se dle fylogenetického stromu řadí mezi producenty manumycinu A, zatímco kmen BCCO10 1552 je samostatně umístěný izolát. Proto se dopředu nedala předpokládat sloučenina, kterou bude tento kmen produkovat a zda či jakým způsobem k ní bude připojena C_5N jednotka. Ani jeden z kmenů neměl na začátku práce osekvenovaný genom. U kmene BCCO10 1552 se úplná sekvence podařila sestavit až v průběhu analýz extraktů sekundárních metabolitů z divokého a nadprodukčního kmene. Po analýze osekvenovaného genomu bylo zjištěno, že kmen BCCO10 1552 neobsahuje kompletní operon pro stavbu C_5N jednotky – obsahuje geny *all* a *als* (*hemA*), *ams* v operonu chybí a nenachází se ani nikde jinde v genomu. Rovněž chybí i další geny kódující biosyntézu manumycinů. V okolí se nachází jen několik, značně rozptýlených genů, které by se mohly účastnit biosyntézy sekundárních metabolitů. Proto výsledky

biologického testu a LC-MS analýz delečního kmene nebyly úplným překvapením, kde mezi jednotlivými vzorky nebyl téměř žádný rozdíl. Vyšší antibiotická aktivita při biologickém testu u delečního kmene (oproti divokému typu) lze vysvětlit buďto nespecifickým efektem genové manipulace při přípravách delečního kmene anebo kultivací spolu s antibiotiky. Obdobně může být zvýšená antibiotická aktivita nadprodukčního kmene (oproti divokému typu) nespecifickým efektem přítomnosti plasmidu pALS4K anebo rovněž důsledkem kultivace s antibiotiky, či kombinací obou. Kdyby sekvence byla dostupná od začátku práce s kmenem BCCO10 1552, s největší pravděpodobností by kmen pro práci vybrán nebyl. Je možné, že genový lokus byl postižen přestavbami účinkem rekombinačních enzymů nebo transpozičních elementů, nebo se do tohoto producenta přenesl mechanismy horizontálního genového přenosu jen zlomek biosyntetických genů, a ty nejsou dále funkční. Ve fylogenetickém stromě se v blízkosti BCCO10 1552 nachází *S. xanthochromogenus*, jenž je producentem reductionmycinu. Jedná se o malou molekulu (293,3 g/mol – pro srovnání asukamycin 546,6 g/mol), jejíž biosyntetická dráha není známa a je také možné, že kmen BCCO10 1552 je producentem podobné bioaktivní molekuly.

Podle BLAST srovnání sekvence pro *als* gen kmene BCCO10 1552 je nejblíže kmen *Streptomyces* sp. NEAU-D10 (87,42% podobnost). Také v genomu tohoto kmene se nikde nenachází gen *ams* esenciální pro připojení C₅N jednotky ke kostře molekuly manumycinu. Rovněž se v blízkosti genů *als* a *all* nachází geny pro místně specifickou integrázu a transpozázu. To by mohlo znamenat, že mezi geny skutečně došlo k takovým přestavbám, že operon i jednotlivé geny pro syntézu C₅N jednotky už nejsou funkční.

Díky nedostupnosti genomové sekvence od samého začátku jsme se též mylně zaměřili na antibiotickou aktivitu, která s tvorbou C₅N jednotky nesouvisí. Nicméně byl metodou LC-MS v 8,66 minutě zaměřen pík, který je za tuto antibiotickou aktivitu zodpovědný a mohl by být předmětem zájmu jiných studií.

Po obdržení iontových map z LC-MS analýz se však podařilo identifikovat ionty, které se nachází pouze ve full scan MS (iontová mapa) nadprodukčního a divokého kmene. U delečního kmene tyto ionty chybí. Mohlo by se jednat o sloučeninu, která se díky deleci genu *als* (*hemA*) přestala u delečního kmene biosyntetizovat. K její identifikaci by bylo vhodné znovu podstoupit frakcionaci vzorku nadprodukčního kmene

a izolovat tuto kritickou oblast, která je však, jak ukázal již biologický test s disky napuštěnými jednotlivými frakcemi, antibioticky neaktivní.

Od kmene BCCO10 1636 jsme díky blízké fylogenetické příbuznosti genu *als* s homologními geny producentů *S. parvulus* a *S. nodosus* sp. *asukaensis* očekávali produkci nových bioaktivních látek manumycinového typu. Analýza okolí genu *als* (*hemA*) odhalila přítomnost kompletního operonu pro tvorbu C₅N jednotky (geny *ams*, *als* a *all*) a další příbuzné geny homologní či podobné s geny biosyntetického shluku pro asukamycin. Při kultivaci v GYM médiu obsahující jako zdroj cukrů glycerol nebo glukózu, jsme pozorovali rozdíly v produkci sekundárních metabolitů. Při kultivaci na glycerolu byly u nadprodukčního kmene velmi patrné změny při TLC analýze, kdy byly pozorovány nové látky absorbující krátkovlnné UV světlo. Také LC-MS analýza extraktu odhalila přítomnost nových sloučenin. Biologický test potvrdil antibiotickou aktivitu u všech tří vzorků, která je nejspíše nespecifická a nesouvisí s biosyntézou C₅N jednotky. Ovšem při kultivaci kmene v GYM médiu obsahujícím glukózu byl biologický test jednoznačnější. Deleční kmen antibiotickou aktivitu nevykazoval ve srovnání s divokým kmenem žádnou antibiotickou aktivitu. U divokého kmene jsme pozorovali vznik jedné inhibiční zóny při biologickém testu s citlivým *B. subtilis*. Nadprodukční kmen pak vytvořil při testu jednu inhibiční zónu navíc s nižší pohyblivostí v daném TLC systému. Mohl by s ní korelovat pík ve 20,28 minutě LC-MS analýzy, který je opět výraznější u nadprodukčního kmene a u delečního chybí.

V okolí *als* operonu se nachází spousta genů souvisejících s funkcí sekundárního metabolismu, jako jsou oxidoreduktázy a transportéry. V blízkosti operonu se také vyskytuje gen pro transposázu, což může opět podpořit teorii, že v genomu došlo k jistým přestavbám, jež narušily biosyntetický shluk pro manumyciny. Je ale možné, že *als* operon je zapojen při biosyntéze jiných skupin látek.

Podle BLAST srovnání sekvence genu *als* kmene BCCO10 1636 s dalšími mikroorganismy, s 87,15% podobností se vyskytl gen kmene *Kitasatospora cheerisanensis*. Opět okolí genu vykazuje jistý překryv, ovšem s výskytem genů pro transpozázy. Opět mohlo dojít k přestavbám genového shluku v takové míře, že již ztratil původní funkčnost anebo neprodukuje očekávané metabolity.

Na závěr bych chtěla zmínit, že tato práce ukázala, že ke genům vždy není snadné přiřadit i odpovídající metabolit, jak se z prvotních genových analýz může zdát.

K potvrzení přítomnosti nových látek obsahujících C₅N jednotku u kmenů ze screeningu jsme chtěli použít MS/MS fragmentaci, kde jsme hledali typické fragmenty odpovídající C₅N jednotce. Takové fragmenty však nalezeny nebyly. Rovněž je vhodné mít před samotnými experimenty k dispozici kompletně osekvenovaný genom a provést jeho analýzu. U obou kmenů totiž došlo nejspíše k takovým přestavbám v genových shlucích, že funkčnost sledovaných genů v tomto případě nebyla jistá. U těchto dvou kmenů, vybraných pouze na základě fylogeneze *als* genu, se podařilo genovými manipulacemi indukovat nové aktivity, nicméně u kmenu BCCO10 1552 je více než jisté, že došlo pouze k nespecifickému efektu, který s tvorbou C₅N jednotky nemá přímou souvislost. Kmen BCCO10 1636 má sice kompletní operon pro C₅N jednotku, ale chybí další geny pro syntézu manumycinů. Výsledky této práce však naznačují, že biosyntéza detekovaných látek s antibiotickou aktivitou by s funkcí operonu kódujícího C₅N jednotku mohla přímo souviset. Dalším krokem by tedy mělo být přenesení genového lokusu do vhodného streptomycetového heterologního producenta pomocí cosmidového nebo BAC vektoru a ověření, zda zde nějaké nové látky s podobnými vlastnostmi vzniknou.

7 Závěr

- Disrupce genu *als* u kmene BCCO10 1552 nevedla ke snížení či utlumení antibiotické aktivity oproti WT, což znamená, že jeho přítomnost produkci látky s touto aktivitou neovlivňuje a její posílení u nadexpresního kmene je pravděpodobně nespecifické.
- Disrupce genu *als* u kmene BCCO10 1636 vedla ke ztrátě antibiotické aktivity oproti WT při kultivaci v médiu obsahujícím jako zdroj cukru glukózu.
- Nadprodukční kmen BCCO10 1552 obsahující plasmid pALS4K vykazoval posílenou antibiotickou aktivitu oproti WT, avšak deleční kmen prokázal, že se jednalo o nespecifický efekt genové manipulace nebo kultivaci v přítomnosti antibiotika.
- Nadprodukční kmen BCCO10 1636 při kultivaci v médiu obsahujícím jako zdroj cukru glukózu vykazoval novou antibiotickou aktivitu oproti WT. BCCO10 1636 při kultivaci v médiu obsahujícím jako zdroj cukru glycerol vykazoval antibiotickou aktivitu nespecifickou u všech tří typů (nadprodukční, WT, deleční).
- Genová analýza 50 Mbp *als* lokusu kmene BCCO10 1552 odhalila, že kmen nemá kompletní *als* operon pro tvorbu C₅N jednotky ani další geny zapojené při biosyntéze manumycinů.
- LC-MS analýza kmene BCCO10 1552 identifikovala retenční čas, kdy dochází k eluci látky odpovědné za nespecifickou antibiotickou aktivitu a byl stanoven potenciální retenční čas pro možnou eluci sloučeniny související s přítomností *als* genu.
- Na iontové mapě extraktů kmene BCCO10 1552 byla mezi 5. a 6. minutou odhalena ztráta iontů v případě delečního kmene oproti WT a nadprodukčního. Je zde možná korelace s delecí *als* genu.
- Genová analýza 50 Mbp *als* lokusu kmene BCCO10 1636 odhalila kompletní operon pro tvorbu C₅N jednotky a několik genů odpovědných za biosyntézu manumycinů, ovšem tento biosyntetický shluk není kompletní.
- LC-MS analýza kmene BCCO10 1636 identifikovala několik píků u extraktu pocházejícího z nadprodukčního kmene a WT kultivovaného v médiu s glukózou, a to v 6,14 a 20,28 minutě. Tyto píky v delečním kmeni naopak chyběly a mohly by tak souviset s delecí *als* genu.

8 Seznam použité literatury

- Austin, M. B., Noel, J. P. (2002): The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Natural Product Reports* 20, 79–110.
- Avignone-Rossa, C., Kierzek, A. M., Bushell, M. E. (2013): Secondary Metabolite Production in *Streptomyces*. *Encyclopedia of Systems Biology, 1903-1913*. (ed.) Dubitzky, W., Wolkenhauer, O., Cho, K. H., Yokota H. Springer New York, 2013, 2367 s., ISBN 978-1-4419-9862-0.
- Baral, B., Akhgari, A., Metsä-Ketelä, M. (2018): Activation of microbial secondary metabolic pathways: Avenues and challenges. *Synthetic and Systems Biotechnology* 3, 163-178.
- Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeño-Tárraga, A.-M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., Harris, D. E., Quail, M. A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C. W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, Huang, S. C.-H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabinowitsch, E., Rajandream, M.-A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B. G., Parkhil, J., Hopwood, D. A. (2002): Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 417, 141–147.
- Běhal, V. (2000): Bioactive products from *Streptomyces*. *Advances in Applied Microbiology* 47, 113–156.
- Bibb, M. J. (2005): Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Current Opinion in Microbiology* 8, 208–215.
- Blin, K., Simon, S., Steinke, K., Villebro, R., Ziemert, N., Lee, S. Y., Medema, M. H., Weber, T. (2019): antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. *Nucleic Acids Research* 47, W81–W87.
- Bobek, J., Šmídová, K., Čihák, M. (2017): A Waking Review: Old and Novel Insights into the Spore Germination in *Streptomyces*. *Frontiers in Microbiology* 8, 2205.
- Bode, H. B., Bethe, B., Höfs, R., Zeeck, A. (2002): Big Effects from Small Changes: Possible Ways to Explore Nature's Chemical Diversity. *ChemBioChem*, 3(7), 619-627.
- Boone, R., Castenholtz, R., Garrity, G. (2001): *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2. vyd. vol. 1. Springer-Verlag, New York, 2001, 722 s., ISBN 978-0-387-21609-6.
- Cao, Y., Jiang, Y., Li, Y. (2012): [Isolation methods and diversity of culturable fecal actinobacteria associated with Panther tigris tigris in Yunnan Safari Park]. *Wei Sheng Wu Xu Bao* 52, 816–824 (in Chinese).

- Cecrdlova, E., Petrickova, K., Kolesar, L., Petricek, M., Sekerkova, A., Svachova, V., Striz, I. (2015): Manumycin A downregulates release of proinflammatory cytokines from TNF alpha stimulated human monocytes. *Immunology Letters* 169, 8–14.
- Challis, G. L. (2008): Mining microbial genomes for new natural products and biosynthetic pathways. *Microbiology* 154, 1555–1569.
- Claessen, D., Rink, R., de Jong, W., Siebring, J., Vreugd, P., Boersma, F. G. H., Dijkhuizen, L., Wösten, H. A. B. (2003): A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation in *Streptomyces coelicolor* by forming amyloid-like fibrils. *Genes & Development* 17, 1714–1726.
- Currie, C. R., Scott, J. A., Summerbell, R. C., Malloch, D. (1999): Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. *Nature* 398, 701–704.
- Dunne, E. F., Burman, W. J., Wilson, M. L. (1998): *Streptomyces Pneumonia* in a Patient with Human Immunodeficiency Virus Infection: Case Report and Review of the Literature on Invasive Streptomyces Infections. *Clinical Infectious Diseases* 27, 93–96.
- Fischbach, M. A., Walsh, C. T. (2006): Assembly-Line Enzymology for Polyketide and Nonribosomal Peptide Antibiotics: Logic, Machinery, and Mechanisms. *Chemical Reviews* 106, 3468–3496.
- Flärdh, K. (2003): Growth polarity and cell division in *Streptomyces*. *Current Opinion in Microbiology* 6, 564–571.
- Fuchino, K., Bagchi, S., Cantlay, S., Sandblad, L., Wu, D., Bergman, J., Kamali-Moghaddam, M., Flärdh, K., Ausmees, N. (2013): Dynamic gradients of an intermediate filament-like cytoskeleton are recruited by a polarity landmark during apical growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, E1889–E1897.
- Gerber, N. N., Lechevalier, H. A. (1965): Geosmin, an earthy-smelling substance isolated from actinomycetes. *Applied Microbiology* 13, 935–938.
- Gomez-Escribano, J. P., Bibb, M. J. (2013): Heterologous expression of natural product biosynthetic gene clusters in *Streptomyces coelicolor*: from genome mining to manipulation of biosynthetic pathways. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 41, 425–431.
- Goodfellow, M. (2012): Phylum XXVI. Actinobacteria phyl. nov. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Michael Goodfellow, Peter Kämpfer, Hans-Jürgen Busse, Martha E. Trujillo, Ken-ichiro Suzuki, Wolfgang Ludwig, William B. Whitman (eds.). 2. vyd. vol. 5. Springer-Verlag, New York, 2012, 2083 s., ISBN 978-0-387-29298-4.
- Hakvag, S., Fjaervik, E., Josefsen, K. D., Ian, E., Ellingsen, T. E., Zotchev, S. B. (2008): Characterization of *Streptomyces* spp. isolated from the sea surface microlayer in the Trondheim Fjord, Norway. *Marine Drugs* 6, 620–635.

- Hara, M., Akasaka, K., Akinaga, S., Okabe, M., Nakano, H., Gomez, R., Wood, D., Uh, M., Tamanoi, F. (1993): Identification of Ras-farnesyltransferase inhibitors by microbial screening. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 2281-2285.
- Hassan, A. M. E., Fahal, A. H., Ahmed, A. O., Ismail, A., & Veress, B. (2001): The immunopathology of actinomycetoma lesions caused by *Streptomyces somaliensis*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 95, 89–92.
- Herbrik, A. (2019): Kolonizácia ľudských pľúc nepatogénnymi streptomycétami. Diplomová práca, Univerzita Karlova v Praze, Praha.
- Hodges, T. W., Slaterry, M., Olson, J. B. (2012): Unique actinomycetes from marine caves and coral reef sediments provide novel PKS and NRPS biosynthetic gene clusters. *Marine Biotechnology* 14, 270–280.
- Hollstein, U. (1974): Actinomycin. Chemistry and mechanism of action. *Chemical Reviews* 74, 625–652.
- Hopwood, D. A. (1997): Genetic Contributions to Understanding Polyketide Synthases. *Chemical Reviews* 97, 2465–2498.
- Hopwood, D. A. (2006): Soil To Genomics: The *Streptomyces* Chromosome. *Annual Review of Genetics* 40, 1-23.
- Hopwood, D. A. (2007): How do antibiotic-producing bacteria ensure their self-resistance before antibiotic biosynthesis incapacitates them? *Molecular Microbiology* 63, 937-940.
- Hu, Y. D. (2000): The biosynthesis of manumycin type metabolites. Dizertační práce, University of Washington, Washington.
- Hu, Y., Melville, C. R., Gould, S. J., Floss, H. G. (1997): 3-Amino-4-hydroxybenzoic Acid: the Precursor of the C₇N Unit in Asukamycin and Manumycin. *Journal of the American Chemical Society* 119, 4301–4302.
- Chater, K. F. (1993): Genetics of Differentiation in *Streptomyces*. *Annual Review of Microbiology* 47, 685–711.
- Chater, K. F., Biro, S., Lee, K. J., Palmer, T., and Schrempf, H. (2010): The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *Fems Microbiology Reviews* 34, 171-198.
- Chen, H., Du, L. (2015): Iterative polyketide biosynthesis by modular polyketide synthases in bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100, 541–557.
- Jones, S. E., Elliot, M. A. (2018): “Exploring” the regulation of *Streptomyces* growth and development. *Current Opinion in Microbiology* 42, 25–30.

- Jones, S. E., Ho, L., Rees, C. A., Hill, J. E., Nodwell, J. R., Elliot, M. A. (2017): *Streptomyces* exploration is triggered by fungal interactions and volatile signals. *eLife* 6:e21738.
- Kaltenpoth, M., Göttler, W., Herzner, G., Strohm, E. (2005): Symbiotic Bacteria Protect Wasp Larvae from Fungal Infestation. *Current Biology* 15, 475–479.
- Kawai, K., Wang, G., Okamoto, S., Ochi, K. (2007): The rare earth, scandium, causes antibiotic overproduction in *Streptomyces* spp. *FEMS Microbiology Letters* 274, 311–315.
- Kämpfer, P., Glaeser, S. P., Parkes, L., van Keulen, G., Dyson, P. (2006): The Family *Streptomycetaceae*. *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria* (ed.) Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. 3 vyd., Springer-Verlag, New York, 2006, s. 538–604, ISBN 978-0-387-30740-4.
- Khatab, A. I., Babiker, E. H., Saeed, H. A. (2016): *Streptomyces*: isolation, optimization of culture conditions and extraction of secondary metabolites. *International Current Pharmaceutical Journal* 5, 27-32.
- Kim, D., Chun, J., Sahin, N., Hah, Y. C., Goodfellow, M.: (1996) Analysis of the thermophilic clades within the genus *Streptomyces* by 16S ribosomal DNA sequence comparisons. *International journal of systematic bacteriology* 46, 581–587.
- Kim, B., Sahin, N., Minnikin, D. E., Zakrzewska-Czerwinska, J., Mordarski, M., Goodfellow, M. (1999): Classification of thermophilic streptomycetes, including the description of *Streptomyces thermoalcalitolerans* sp. *International journal of systematic bacteriology* 49, 7–17.
- Koba, M., Konopa, J. (2005): Actinomycin D and its mechanisms of action. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 59, 290-298 (in Polish).
- Kurapova, A. I., Zenova, G. M., Sudnitsyn, I. I., Kizilova, A. K., Manucharova, N. A., Norovsuren, Z., Zvyagintsev, D. G. (2012): Thermotolerant and thermophilic actinomycetes from soils of Mongolia desert steppe zone. *Microbiology (Moscow)* 81, 98–108.
- Li, J.-G., She, M., Lu, C.-Y., Wei, S.-S., Xia, P.-F., Lu, Z.-S., & Peng, Q. (2014): Manumycin induces apoptosis in prostate cancer cells. *OncoTargets and Therapy* 22, 771.
- Lin, C., Tsai, C.-H., Chen, P.-Y., Wu, C.-Y., Chang, Y.-L., Yang, Y.-L., Chen, Y.-L. (2018): Biological control of potato common scab by *Bacillus amyloliquefaciens* Ba01. *Plos One* 13, e0196520.
- Manteca, A., Claessen, D., Lopez-Iglesias, C., Sanchez, J. (2007): Aerial hyphae in surface cultures of *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* originate from viable segments surviving an early programmed cell death event. *FEMS Microbiology Letters* 274, 118–125.

- Manteca, A., Sanchez, J. (2010): *Streptomyces* developmental cycle and secondary metabolite production. A. Mendez-Vilas (ed). Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. 1. vyd. Formatex Research center, Badajoz, 2010, 788 s., ISBN 978-84-614-6194-3.
- McDaniel, R., Ebert-Khosla, S., Hopwood, D. A., Khosla, C. (1993): Engineered biosynthesis of novel polyketides. *Science* 262, 1546–1550.
- Miguélez, E. M., Hardisson, C., and Manzanal, M. B. (1999): Hyphal death during colony development in *Streptomyces antibioticus*: Morphological evidence for the existence of a process of cell deletion in a multicellular prokaryote. *Journal of Cell Biology* 145, 515-525.
- Mishra, R., Dhakal, D., Han, J., Lim, H., Jung, H., Yamaguchi, T., Sohng, J. (2019): Production of a Novel Tetrahydroxynaphthalene (THN) Derivative from *Nocardia* sp. CS682 by Metabolic Engineering and Its Bioactivities. *Molecules*, 24, 244-258.
- Moore, C. P., Heller, N., Majors, L. J., Whitley, R. D., Burgess, E. C., Weber, J. (1988): Prevalence of ocular microorganisms in hospitalized and stabled horses. *American journal of veterinary research* 49, 773-777.
- Muth, G., Nußbaumer, B., Wohlleben, W., Pühler, A. (1989): A vector system with temperature-sensitive replication for gene disruption and mutational cloning in streptomycetes. *Molecular Genetics and Genomics* 219, 341–348.
- Nandhini, S., Selvam, M. M. (2013): Bioactive compounds produced by *Streptomyces* strain. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 5, 176-178.
- Nechitaylo ,T. Y., Westermann, M., Kaltenpoth, M. (2014): Cultivation reveals physiological diversity among defensive '*Streptomyces philanthi*' symbionts of beewolf digger wasps (*Hymenoptera*, *Crabronidae*). *BMC Microbiology* 14:202.
- Nicholls, P., Allen, G., Irwin, P. (2014): *Streptomyces cyaneusdermatitis* in a dog. *Australian Veterinary Journal* 92, 38–40.
- Ochi, K. (2016): Insights into microbial cryptic gene activation and strain improvement: principle, application and technical aspects. *The Journal of Antibiotics* 70, 25–40.
- Ohta, Y., Ikeda, M. (1978): Deodorization of pig feces by actinomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 36, 487–491.
- Omura, S., Kitao, Ch., Tanaka, H., Oiwa, R., Takahashi, Y., Nakagawa, A., Shimada, M., Iwai, Y. (1976): A new antibiotic, asukamycin, produced by *Streptomyces*. *The Journal of Antibiotics* 29, 876-881.
- Onaka, H., Mori, Y., Igarashi, Y., Furumai, T. (2011): Mycolic acid-containing bacteria induce natural-product biosynthesis in *Streptomyces* species. *Applied and environmental microbiology* 77, 400-406.

- Paget, M. S. B., Chamberlin, L., Atrih, A., Foster, S. J., Buttner, M. J. (1999): Evidence that the Extracytoplasmic Function Sigma Factor ζ E Is Required for Normal Cell Wall Structure in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology* 181, 204–211.
- Petříček M., Petříčková K., Havlíček L and Felsberg J. (2006): Occurrence of two 5-aminolevulinate biosynthetic pathways in *Streptomyces nodosus* subsp. *asukaensis* is linked with the production of asukamycin. *Journal of Bacteriology* 188, 5113-5123.
- Petříčková, K., Pospíšil, S., Kuzma, M., Tylová, T., Jágr, M., Tomek, P., Chroňáková, A., Brabcová, E., Anděra, L., Křišťůfek, V., Petříček, M. (2014): Biosynthesis of Colabomycin E, a New Manumycin-Family Metabolite, Involves an Unusual Chain-Length Factor. *ChemBioChem*, 15, 1334–1345.
- Petříčková, K., Chroňáková, A., Zelenka, T., Chrudimský, T., Pospíšil, S., Petříček, M., Křišťůfek, V. (2015): Evolution of cyclizing 5-aminolevulinate synthases in the biosynthesis of actinomycete secondary metabolites: outcomes for genetic screening techniques. *Frontiers in Microbiology* 8/4, eCollection 2015.
- Pinheiro, G. L., de Azevedo-Martins, A. C., Albano, R. M., de Souza, W., Frases, S. (2016): Comprehensive analysis of the cellulolytic system reveals its potential for deconstruction of lignocellulosic biomass in a novel *Streptomyces* sp. *Applied microbiology and biotechnology* 101, 301-319.
- Procópio R. E., Silva I. R., Martins M. K., Azevedo J. L., Araújo J. M. (2012): Antibiotics produced by *Streptomyces*. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 16, 466-471.
- Reinke, S. I., Ihrke, P. J., Reinke, J. D., Stannard, A. A., Jang, S. S., Gillette, D. M., Hallock, K. W. (1986): Actinomycotic mycetoma in a cat. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 189, 446-448.
- Rodriguez-Garcia, A., Combes, P., Perez-Redondo, R., Smith, M. C., Smith, M. C. (2005): Natural and synthetic tetracycline-inducible promoters for use in the antibiotic-producing bacteria *Streptomyces*. *Nucleic Acids Res.* 33(9):e87.
- Rui, Z., Petříčková, K., Škanta, F., Pospíšil, S., Yang, Y., Chen, C.-Y., Tsai, F.-S., Floss, H. G., Petříček, M., Yu, T.-W. (2010): Biochemical and Genetic Insights into Asukamycin Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* 285, 24915–24924.
- Sattler, I., Thiericke, R., Zeeck, A. (1998): The manumycin-group metabolites. *Natural Product Reports* 15, 221-241.
- Seipke, R. F., Kaltenpoth, M., Hutchings, M. I. (2012): *Streptomyces* as symbionts: an emerging and widespread theme? *FEMS Microbiology reviews* 36, 862-876.
- Schäfer, A., Konrad, R., Kuhnigk, T., Kämpfer, P., Hertel, H., König, H. (1996): Hemicellulose-degrading bacteria and yeasts from the termite gut. *Journal of Applied Bacteriology* 80, 471–478.

- Schäfer, A., Ustohal, P., Harms, H., Stauffer, F., Dracos, T., & Zehnder, A. J. (1998): Transport of bacteria in unsaturated porous media. *Journal of Contaminant Hydrology* 33, 149–169.
- Shu, Y.-Z., Huang, S., Wang, R. R., Lam, K. S., Klohr, S. E., Volk, K. J., Pirnik, D. M., Wells, J. S., Fernandes P. B., Patel, P. S. (1994): Manumycins E,F and G, new members of manumycin class antibiotics, from *Streptomyces* sp. *The Journal of Antibiotics* 47, 324–333.
- Tahlan, K., Ahn, S. K., Sing, A., Bodnaruk, T. D., Willems, A. R., Davidson, A. R., Nodwell, J. R. (2007): Initiation of actinorhodin export in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology* 63, 951–961.
- Tanaka, T., Tsukuda, E., Uosaki, Y., Matsuda, Y. (1996): EI-1511-3, -5 and EI-1625-2, Novel Interleukin-1 β Converting Enzyme Inhibitors Produced by *Streptomyces* sp. E-1511 and E-1625. III. Biochemical Properties of EI-1511-3, -5 and EI 1625-2. *The Journal of Antibiotics*, 49, 1085–1090.
- Thiericke, R., Zeeck, A., Nakagawa, A., Omura, S., Herrold, R. E., Wu, S. T. S., Beale, J. M., Floss, H. G. (1990): Biosynthesis of the manumycin group antibiotics. *Journal of the American Chemical Society* 112, 3979–3987.
- Vetsigian, K., Jajoo, R., & Kishony, R. (2011): Structure and Evolution of *Streptomyces* Interaction Networks in Soil and In Silico. *PLoS Biology* 9, e1001184.
- Vurukonda, S. S. K. P., Giovanardi D., Stefani E. (2018): Plant Growth Promoting and Biocontrol Activity of *Streptomyces* spp. as Endophytes. *International Journal of Molecular Sciences* 19, 952-978.
- Xu, L., Ye, K. X., Dai, W. H., Sun, C., Xu, L. H., Han, B. N. (2019): Comparative Genomic Insights into Secondary Metabolism Biosynthetic Gene Cluster Distributions of Marine *Streptomyces*. *Marine Drugs* 17, 498-516.
- Zenova, G. M., Kurapova, A. I., Lysenko, A. M., Zvyagintsev, D. G. (2009): The structural-functional organization of thermotolerant complexes of actinomycetes in desert and volcanic soils. *Eurasian Soil Science* 42, 531–535.
- Zhang, Y., Loria, R. (2017): Emergence of Novel Pathogenic *Streptomyces* Species by Site-Specific Accretion and cis-Mobilization of Pathogenicity Islands. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 30, 72-82.
- Waksman, S. A., Woodruff, H. B. (1940): Bacteriostatic and Bactericidal Substances Produced by a Soil Actinomycetes. *Experimental Biology and Medicine* 45, 609–614.
- Waksman, S. A., Umbreit, W. W., Gordon, T. C. (1939): Thermophilic actinomycetes and fungi in soils and in composts. *Soil Science* 47, 37-61.

Watve, M., Tickoo, R., Jog, M., & Bhole, B. (2001): How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces* ? Archives of Microbiology 176, 386–390.

Zhang, Y., Jiang, G., Ding, Y., Loria R. (2018): Genetic background affects pathogenicity island function and pathogen emergence in *Streptomyces*. Molecular Plant Pathology 19, 1733–1741.

Zhang, W., Bolla, M. L., Kahne, D., Walsh, C. T. (2010): A Three Enzyme Pathway for 2-Amino-3-hydroxycyclopent-2-enone Formation and Incorporation in Natural Product Biosynthesis. Journal of the American Chemical Society 132, 6402–6411.

Zhang, J., Xie, L., Hu, J., Li, L., Yang, M., Jiang, H., Li, L., Mi, Y., Cheng, L., Qian, X., Liu, B. (2016): Antitumor effect of manumycin on colorectal cancer cells by increasing the reactive oxygen species production and blocking PI3K-AKT pathway. OncoTargets and Therapy 9, 2895-2885.

Zhang, W., Tang, Y. (2009): In Vitro Analysis of Type II Polyketide Synthase. Methods in Enzymology 459, 367–393.

Zhao, X. Q., Li, W. J., Jiao, W. C., Li, Y., Yuan, W. J., Zhang, Y. Q., Klenk, H. P., Suh, J. W., Bai, F. W. (2009): *Streptomyces xinghaiensis* sp. nov., isolated from marine sediment. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 59, 2870–2874.

Zhou, J. M., Zhu, X. F., Pan, Q. C., Liao, D. F., Li, Z. M., & Liu, Z. C. (2003): Manumycin inhibits cell proliferation and the Ras signal transduction pathway in human hepatocellular carcinoma cells. International Journal of Molecular Medicine 11, 767-771.

Zijlstra, E. E., van de Sande, W. W. J., Welsh, O., Mahgoub, E. S., Goodfellow, M., Fahal, A. H. (2016): Mycetoma: a unique neglected tropical disease. The Lancet Infectious Diseases, 16, 100–112.